



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Deteção e caracterização de adenovírus em amostras fecais de
primatas não humanos em cativeiro**

Nicole Rodrigues Lourenço

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS, ESPECIALIDADE EM BIOLOGIA MOLECULAR EM SAÚDE
TROPICAL E INTERNACIONAL

JANEIRO, 2016



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Deteção e caracterização de adenovírus em amostras fecais de
primatas não humanos em cativeiro**

Autor: Nicole Rodrigues Lourenço

Orientador: Professora Doutora Aida Esteves

Coorientador: Professor Doutor João Piedade

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, Especialidade em Biologia Molecular em Saúde Tropical e Internacional

Agradecimentos

Agradeço especialmente à minha orientadora, Professora Doutora Aida Esteves, por toda a orientação e partilha de conhecimentos. Ainda, pelo entusiasmo contagiante demonstrado no decorrer de todo o projeto, pela sua paciência, dedicação, disponibilidade e apoio absolutos.

Ao meu coorientador, Professor Doutor João Piedade, pelos conhecimentos partilhados durante a sua orientação. As suas palavras de incentivo e boa disposição, assim como a sua paciência, disponibilidade e rigor foram imprescindíveis.

Ao Professor Doutor Ricardo Parreira, pelas suas preciosas aulas de bioinformática.

Ao Jardim Zoológico de Lisboa, nomeadamente Doutora Teresa Lobo Fernandes, Doutor Rui Bernardino e Doutor Narciso Lapão, por toda a disponibilidade e simpatia, cuja cooperação permitiu a realização deste trabalho.

A todo o restante Grupo de Virologia da Unidade de Ensino e Investigação de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pelo acolhimento caloroso e simpatia, em especial à Técnica Superior Ângela Mendes por toda a disponibilidade para ajudar em tudo.

Às amigas e colegas de mestrado, que ajudaram a criar momentos de convívio e descontração e que partilharam comigo esta etapa marcante das nossas vidas.

À minha família e amigos, por toda a paciência, compreensão e apoio incondicionais.

Resumo

Os adenovírus (AdVs), vírus de genoma de DNA, sem invólucro e com simetria icosaédrica, infetam uma ampla gama de hospedeiros vertebrados. Os AdVs de primatas pertencem ao género *Mastadenovirus* distribuindo-se pelas espécies A a G humanas (HAdV-A a -G) e A símia (SAdV-A). Nos últimos anos, a vetorização de AdVs de primatas não humanos (PNH) para utilização em vacinas, terapia génica e oncoterapia estimulou o seu estudo e resultou na descoberta de novos vírus com relações filogenéticas complexas entre si e com os AdVs humanos e, nalguns casos, associados a transmissão zoonótica.

Neste estudo, 128 amostras fecais de 34 espécies de PNH assintomáticos (grandes símios, macacos do Velho Mundo, macacos do Novo Mundo, gibões e lémures) do Jardim Zoológico de Lisboa foram testadas relativamente à presença de AdVs através da amplificação, por *nested*-PCR, de duas regiões conservadas dos genes da DNA polimerase (DNA-Pol) (~650 pb) e do hexão (~380 pb). Em 82,8% das amostras foram detetados amplicões com o tamanho esperado para pelo menos um dos genes. A análise filogenética de 13 sequências da DNA-Pol e 24 sequências do hexão revelou uma grande diversidade genética dos AdVs detetados refletindo a variedade de espécies dos hospedeiros. Com base na análise filogenética, classificou-se tentativamente os AdVs de chimpanzés nas espécies HAdV-C e -E e de gorila e orangotango na HAdV-B. Quando sujeita a análise de recombinação por *bootscanning*, uma sequência de DNA-Pol muito divergente de AdV de chimpanzé revelou um evento raro de recombinação interespecífica envolvendo HAdV-B e -E. As sequências de AdVs de gibões, aqui identificados pela primeira vez, apesar de agrupadas com HAdV-B, -C, -D e -E, são filogeneticamente muito afastadas podendo vir a constituir uma nova espécie. Relativamente aos AdVs dos macacos do Velho Mundo, as suas sequências surgem dispersas nas árvores filogenéticas dentro dos agrupamentos de HAdV-G e da recém-proposta SAdV-E ou ainda como ramos isolados que poderão corresponder a novos tipos ou mesmo espécies. Os AdVs identificados em saguins-imperador são filogeneticamente próximos do AdV previamente isolado de macacos-titi, outra espécie de macaco do Novo Mundo. Finalmente, foram obtidas pela primeira vez sequências nucleotídicas de AdVs de lémures, que se posicionam separadamente da árvore evolutiva dos AdVs de primatas, formando um agrupamento com sequências de AdVs de uma variedade de outros mamíferos, incluindo suínos, ovinos e equinos.

O tamanho das sequências nucleotídicas de AdVs analisadas é limitativo para a classificação inequívoca de muitos AdVs identificados, pelo que sequências completas dos genes alvo ou de genomas completos deverão futuramente ser obtidas. Paralelamente à deteção de genoma viral, as amostras fecais esterilizadas por filtração foram inoculadas em culturas contínuas de células humanas (A549), no caso dos grandes símios, de macaco-verde-africano (Vero E6), para as restantes espécies, ou ainda em células de suíno (PK15) para AdVs de lémures após análise filogenética. Obteve-se replicação viral para muitos dos AdVs potencialmente mais interessantes (*e.g.* eventuais novos tipos ou espécies), facto relevante para a sequenciação e caracterização dos respetivos genomas, bem como para a sua potencial utilização como vetores.

Palavras-chave: adenovírus, primatas não humanos, amostras fecais, DNA polimerase, hexão

Abstract

Adenoviruses (AdVs) are non-enveloped icosahedral double-stranded DNA viruses that infect a broad range of vertebrate hosts. Primate AdVs belong to the genus *Mastadenovirus* and are officially categorized into human species A to G (HAdV-A to -G) and simian A (SAdV-A). In recent years, non-human primate (NHP) AdVs have been used as vectors for vaccines, genetic therapy and oncotherapy, with a concomitant increase of genomic data, both from previously incompletely characterized isolates and newly discovered viruses, revealing complex phylogenetic relationships among them and with human AdVs and even zoonotic transmission events.

In the present study, 128 faecal samples from 34 species of asymptomatic NHP housed at the Lisbon Zoo, comprising great apes, Old World monkeys, New World monkeys, gibbons, and lemurs, were tested for AdVs. *Nested*-PCR amplification targeting two conserved regions from the viral DNA polymerase (DNA-Pol) (~650 bp) and hexon (~380 bp) genes was carried out. Amplicons with the expected length, at least for one of the genes, were detected in 82.8% of the samples. Phylogenetic analysis performed with 13 DNA-Pol sequences and 24 hexon sequences demonstrated a high genetic diversity of AdVs, somehow reflecting the plethora of host species. Based on phylogenetic analysis, chimpanzee AdVs were tentatively allocated to HAdV-C and -E species while those from one gorilla and orangutan were classified as HAdV-B. A rare event of interspecies recombination, between HAdV-B and -E, was revealed by bootscanning analysis in a chimpanzee AdV with a highly divergent DNA-Pol sequence. Gibbon AdVs, herein detected for the first time, clustered with HAdV-B, -C, -D, and -E species in a separate distant branch probably awaiting its inclusion in a new species. AdVs sequences detected in Old World monkeys grouped with HAdV-G and the recently proposed SAdV-E, or appeared as isolated branches dispersed in the phylogenetic trees and might correspond to new types or even species. AdVs originating from bearded emperor tamarins were closely related to the previously isolated from titi monkeys, another New World monkey species. Furthermore, the first AdVs sequences from three lemur species are reported in this work, grouping together with a bootstrap value $\geq 84\%$ in both trees. Interestingly, they cluster with a variety of mammal AdVs (*e.g.* swine, ovine and equine), well apart from the primate AdVs evolutionary branches. There was no evidence of AdVs cross species transmission events among the captive animals analysed.

The limited length of the amplified DNA fragments hindered the definitive allocation of some identified NHP AdVs to a particular species and complete gene sequences or full-genome sequences should be obtained for further characterization. Following collection, sterile-filtered stool specimens from the great apes or the remaining NHP were respectively inoculated into human (A549) or monkey (Vero E6) cells, or later on (after the results of phylogenetic analysis) into pig cells (PK15) in the case of lemurs. Virus replication was detected for some of the potentially new AdVs types or species, a result that positively impacts future full genome sequencing and their putative development as vectors.

Keywords: adenoviruses, non-human primates, faecal samples, DNA polymerase, hexon

Índice Geral

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
<i>Abstract</i>	iv
Índice Geral.....	v
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas, Siglas ou Acrónimos	ix

1. Introdução	1
1.1. Adenovírus: perspetiva histórica.....	3
1.2. Estrutura do virião	4
1.3. Estrutura e organização genómica	6
1.4. Ciclo replicativo	8
1.5. Classificação e diversidade genética	12
1.6. Gama de hospedeiros e doença	17
1.7. Adenovírus como vetores de vacinação, terapia génica e oncoterapia	20
1.8. Objetivos	22
2. Material e Métodos.....	24
2.1. População de primatas não humanos e amostragem	25
2.2. Colheita e processamento de amostras biológicas	27
2.3. Inoculação de culturas celulares.....	28
2.4. Extração de DNA	29
2.5. Detecção de adenovírus por PCR	30
2.5.1. Amplificação de segmentos dos genes da DNA polimerase e do hexão ..	30
2.6. Análise dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose	31
2.7. Purificação de produtos de PCR	31
2.8. Clonagem molecular	32
2.8.1. Ligação do fragmento de DNA ao vetor <i>pGEM®-T Easy</i>	33
2.8.2. Preparação de células <i>Escherichia coli</i> JM109 competentes.....	33
2.8.3. Transformação por choque térmico	34
2.8.4. Extração de DNA plasmídico pelo método de lise alcalina.....	34
2.8.5. Digestão enzimática	35

2.8.6.	Purificação de DNA plasmídico	35
2.9.	Sequenciação de DNA	36
2.10.	Análise bioinformática de sequências nucleotídicas	36
2.10.1.	Análise de cromatogramas e edição de sequências	36
2.10.2.	Pesquisa de homologia genética	37
2.10.3.	Análise filogenética	37
2.10.4.	Análise de sequências divergentes.....	38
3.	Resultados	39
3.1.	Deteção de adenovírus por PCR	40
3.2.	Deteção de adenovírus em culturas celulares.....	44
3.3.	Clonagem molecular de sequências nucleotídicas de adenovírus em vetor plasmídico	45
3.4.	Análise bioinformática de sequências nucleotídicas.....	47
3.4.1.	Relações filogenéticas baseadas em sequências da DNA polimerase	49
3.4.2.	Relações filogenéticas baseadas em sequências do hexão.....	52
3.4.3.	Comparação das relações filogenéticas baseadas em sequências da DNA polimerase e do hexão	55
3.4.4.	Análise de sequências divergentes.....	57
4.	Discussão e Conclusões.....	59
5.	Referências Bibliográficas	78
6.	Anexos.....	90

Índice de Figuras

Figura 1.1 Estrutura do virião de adenovírus.....	4
Figura 1.2 Esquema representativo do genoma do adenovírus humano C tipo 2.....	7
Figura 1.3 Ciclo replicativo de adenovírus.....	9
Figura 2.1 Representação gráfica da distribuição da amostra de primatas não humanos em função do grupo a que pertencem	25
Figura 2.2 Fluoxograma dos procedimentos laboratoriais seguidos para isolamento, detecção e caracterização de adenovírus a partir de amostras fecais de primatas.....	27
Figura 2.3 Mapa do vetor <i>pGEM[®]-T Easy</i>	33
Figura 3.1 Amplificação por <i>nested</i> -PCR da região codificadora da DNA polimerase antes e depois do processamento das suspensões fecais por filtração e com alteração da temperatura de hibridação de <i>primers</i>	41
Figura 3.2 Efeito do pré-tratamento de suspensões fecais com Benzonase [®] na amplificação por <i>nested</i> -PCR da região codificadora da DNA polimerase após filtração e após filtração associada a tratamento com Benzonase [®]	41
Figura 3.3 Amplificação por <i>nested</i> -PCR das regiões codificadoras da DNA polimerase e do hexão	42
Figura 3.4 Amplificação por <i>nested</i> -PCR das regiões codificadoras da DNA polimerase e do hexão, com identificação dos fragmentos de DNA obtidos para clonagem	46
Figura 3.5 Perfis de digestão, com EcoRI, da clonagem de sequências nucleotídicas de DNA polimerase e hexão	47
Figura 3.6 Representação gráfica do número de sequências de adenovírus obtidas comparativamente ao número de fragmentos de DNA clonados sequenciados, em função da região codificadora.....	47
Figura 3.7 A) Árvore filogenética de adenovírus baseada em sequências codificadoras da DNA polimerase. B) Análise de <i>bootscanning</i>	50
Figura 3.8 A) Árvore filogenética de adenovírus baseada em sequências codificadoras do hexão. B) Análise de <i>bootscanning</i>	53

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 Listagem de adenovírus humanos e símios identificados	15
Tabela 2.1 Descrição da amostra de primatas não humanos em estudo	26
Tabela 2.2 <i>Primers</i> utilizados para a amplificação de segmentos dos genes da DNA polimerase e do hexão.....	30
Tabela 2.3 Condições de amplificação de segmentos dos genes da DNA polimerase e do hexão	31
Tabela 3.1 Taxas de detecção de adenovírus por PCR em amostras fecais de primatas de acordo com a espécie hospedeira de origem.....	43
Tabela 3.2 Sequências nucleotídicas de adenovírus obtidas a partir de amostras fecais de primatas do Jardim Zoológico de Lisboa.....	48

Lista de Abreviaturas, Siglas ou Acrônimos

A, C, G, T	Adenina, Citosina, Guanina, Timina (bases orgânicas constituintes dos nucleótidos)
ADB	Tampão de dissolução da agarose, do inglês <i>Agarose Dissolving Buffer</i>
AdV(s)	Adenovírus
AS	Reverso, do inglês <i>Antisense</i>
BLAST	Programa bioinformático, do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAR	Recetor celular, do inglês <i>Coxsackie virus and Adenovirus Receptor</i>
CD46	Recetor celular, do inglês <i>Cluster Differentiation type 46</i>
CO₂	Dióxido de carbono
CPE	Efeito citopático, do inglês <i>Cytopathic Effect</i>
D.O.	Densidade ótica
DBP	Proteína de ligação a DNA viral de cadeia simples, do inglês <i>single-stranded DNA-Binding Protein</i>
dCMP	Desoxicitidina monofosfato, do inglês <i>Deoxycytidine Monophosphate</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNA-Pol	DNA polimerase viral
dsDNA	DNA de cadeia dupla, do inglês <i>double-stranded DNA</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E.U.A.	Estados Unidos da América
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético, do inglês <i>Ethylenediaminetetracetic Acid</i>
FBS	Soro fetal bovino, do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>
HAdV-n	Adenovírus humano n (n=número arábico), referência a tipo
HAdVs	Adenovírus humanos
HAdV-X	Adenovírus humano X (X=A a G), referência a espécie
HCV	Vírus da hepatite C, do inglês <i>Hepatitis C Virus</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HVR	Regiões hipervariáveis, do inglês <i>Hypervariable Region</i>
I	Inosina (nucleósido)

ICTV	Comité Internacional de Taxonomia de Vírus, do inglês <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranósido
ITR	Repetições terminais invertidas, do inglês <i>Inverted Terminal Repeats</i>
IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais, do inglês <i>International Union for Conservation of Nature</i>
kpb	Quilopares de bases (10^3 pares de bases)
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
MAFFT	Programa bioinformático, do inglês <i>Multiple Alignment using Fast Fourier Transform</i>
MEGA	Programa bioinformático, do inglês <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MEM	Meio de cultura, do inglês <i>Minimum Essential Medium</i>
MLP	Promotor <i>major</i> tardio, do inglês <i>Major Late Promoter</i>
MNM	Macacos do Novo Mundo
mRNAs	Ácido ribonucleico mensageiros, do inglês <i>messenger Ribonucleic Acid</i>
MVM	Macacos do Velho Mundo
pb	Pares de bases
PBS	Tampão de fosfatos salino, do inglês <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PNH	Primatas não humanos
RC	Replicação competente
RD	Replicação defetiva
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
S	Direto, do inglês <i>Sense</i>
SAdV-n	Adenovírus símio n (n=número arábico), referência a tipo
SAdVs	Adenovírus símios
SAdV-X	Adenovírus símio X (X=A a G), referência a espécie
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio, do inglês <i>Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>

SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SIV	Vírus da imunodeficiência símia, do inglês <i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TP	Proteína terminal, do inglês <i>Terminal Protein</i>
TSS	Solução de transformação e armazenamento, do inglês <i>Transformation and Storage Solution</i>
UV	Radiação ultravioleta
VA RNA	RNA associado ao vírus, do inglês <i>Virus-Associated RNA</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-tiogalactopiranósido

1. Introdução

1. Introdução

A partilha de habitat entre seres humanos e primatas não humanos (PNH) sempre existiu. Porém, o contato entre ambos tem vindo a intensificar-se devido à expansão geográfica de populações humanas e ao aumento de atividades envolvendo PNH. Entre estas destacam-se o turismo em regiões de vida selvagem e o contato próximo em parques ou jardins zoológicos, bem como em centros de investigação científica que utilizam PNH como modelos animais (Gillespie *et al.*, 2008; Ryan & Walsh, 2011). No entanto, a exposição mais intensa parece estar ligada à caça furtiva e subsequente preparação da carne (Mossoun *et al.*, 2015). Estes fatores, associados à proximidade filogenética existente, nomeadamente entre grandes símios e o Homem, facultam as condições ideais para a ocorrência de transferência de agentes patogénicos (Davies & Pedersen, 2008). Algumas doenças infecciosas emergentes são uma consequência deste processo, podendo ameaçar a saúde humana a nível global e também levar à diminuição das populações de primatas (Gillespie *et al.*, 2008; Ryan & Walsh, 2011).

Do ponto de vista da saúde humana, cerca de 60% das doenças infecciosas emergentes têm origem zoonótica (Jones *et al.*, 2008). Desde há muito que se verifica interesse na identificação de potenciais zoonoses associadas a PNH (Gillespie *et al.*, 2008). Contudo, a constatação da transmissão do vírus da imunodeficiência símia (SIV) a partir de PNH, originando a pandemia global do vírus da imunodeficiência humana/síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/SIDA) (Gao *et al.*, 1999), despoletou ainda mais este interesse. A malária e a febre hemorrágica por Ebola são também exemplos de doenças infecciosas com grande impacto na saúde global com origem em hospedeiros PNH (Wolfe *et al.*, 2007). Por outro lado, não sendo um processo unidirecional, a transmissão de agentes patogénicos de humanos para PNH também ocorre. Estão descritos na literatura, a título de exemplo, surtos de doenças respiratórias em chimpanzés provocados por paramixovírus humanos (Kaur *et al.*, 2008; Köndgen *et al.*, 2008) e um caso de paralisia flácida aguda num chimpanzé causada por enterovírus humano (Mombo *et al.*, 2015). Num estudo recente estimou-se que o tempo de recuperação para uma população de gorilas afetada por um único surto pode variar entre cerca de 5 anos, *e.g.* doença respiratória com uma taxa de mortalidade baixa, e 131 anos num surto de vírus Ebola com 96% de mortalidade (Ryan & Walsh, 2011). Para além disso, mais recentemente foi

evidenciada a existência de doença enzoótica por SIV (Keele *et al.*, 2009) que levanta questões relativamente a possíveis impactos negativos nas taxas de nascimento e sobrevivência potenciados por outros agentes infecciosos que inicialmente aparentavam não provocar doença, como *simian foamy virus* e adenovírus (AdVs) (Ryan & Walsh, 2011).

Segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN, 2015), das 414 espécies de primatas estabelecidas, 49% são consideradas ameaçadas. Uma vez que é escassa a informação acerca de padrões de infecção em PNH, torna-se relevante o seu estudo para antecipar e avaliar possíveis doenças infecciosas nas populações humanas e de PNH (Gillespie *et al.*, 2008).

1.1. Adenovírus: perspetiva histórica

Os AdVs foram isolados e caracterizados como agentes virais em 1953 quase simultaneamente por dois grupos de investigação distintos (Berk, 2013; Echavarría, 2015; Wold & Ison, 2013). Rowe e colaboradores descreveram um “agente de degeneração dos adenoides” ao tentarem estabelecer linhas de cultura de tecidos a partir de amígdalas e adenoides removidos por cirurgia de crianças (Rowe *et al.*, 1953). Alguns meses depois, Hilleman e Werner isolaram um agente similar a partir de recrutas do exército que apresentavam doença respiratória e designaram-no “agente de doença respiratória” (Hilleman & Werner, 1954). Mais tarde, provou-se que os dois vírus isolados estavam relacionados e, em 1956, foram denominados adenovírus devido ao tecido original (adenoides) onde foram descobertos (Enders *et al.*, 1956). “Adeno” tem origem na palavra grega *aden*, *adenos* que significa glândula (Harrach *et al.*, 2011).

O isolamento de AdVs a partir de PNH surgiu pouco depois da sua caracterização inicial. Hull e colaboradores identificaram este vírus em culturas primárias de células de rim de macaco usadas para a propagação de poliovírus durante o desenvolvimento da vacina da poliomielite (Hull *et al.*, 1956, 1958). Posteriormente, foram também encontrados em zangaratoas retais e amostras fecais colhidas de macacos e chimpanzés em cativeiro (Hoffert *et al.*, 1958; Rowe *et al.*, 1956).

Depois da sua descoberta, os AdVs foram amplamente utilizados como modelo de estudo da base molecular da estrutura, replicação e patogénese viral, assim como de processos biológicos das células eucarióticas. Neste contexto, a contribuição mais

marcante para a biologia moderna talvez tenha sido a descoberta do processo de *splicing* de RNA em 1977 (Berget *et al.*, 1977). Ainda, em 1962, Trentin e colaboradores descobriram que quando da inoculação de AdV humano 12 (HAdV-12) em *hamsters* recém-nascidos, estes desenvolviam tumores malignos (Trentin *et al.*, 1962), demonstrando pela primeira vez a tumorigenicidade de um vírus humano. Contudo, apesar da demonstração clara do potencial tumorigénico em roedores, até agora não existem evidências irrefutáveis para a associação de AdVs a tumores em humanos (Wold & Ison, 2013). Mais recentemente, têm sido alvo de interesse como vetores na área da terapia génica e das vacinas (Campos & Barry, 2007).

1.2. Estrutura do virião

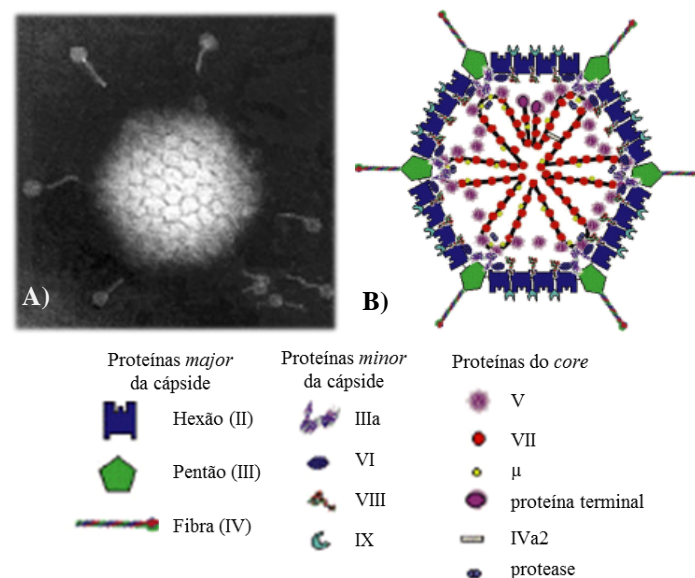


Figura 1.1 Estrutura do virião de adenovírus: imagem por microscopia eletrônica (de Linda Stannard, Departamento de Microbiologia Médica, Universidade da Cidade do Cabo) (A) e representação esquemática (B). Adaptado de Russell, 2009 e Sander, 2007.

Os membros da família *Adenoviridae* são partículas virais sem invólucro lipídico, com cápside de simetria icosaédrica (70-90 nm de diâmetro) que alberga no seu interior um nucleótide (*core*) formado pelo DNA genómico viral e proteínas associadas. As imagens de microscopia eletrónica de transmissão revelam fibras típicas, de 12-32 nm de comprimento e uma massa globular terminal, que se projetam dos vértices do icosaedro e conferem aos viriões um diâmetro global de aproximadamente 150 nm (Sander, 2007).

Os viriões são constituídos por 13 proteínas estruturais que podem ser divididas em três classes, consoante a sua localização e abundância relativa, designadamente proteínas *major* da cápside, proteínas *minor* da cápside e proteínas do *core* (Figura 1.1) (Russell, 2009). As proteínas estruturais são designadas por um numeral romano com base na mobilidade relativa em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE, do inglês *sodium dodecyl sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Avanços recentes nas técnicas de criomicroscopia eletrónica, cristalografia de raio-X e proteómica baseada em espetrometria de massa permitiram determinar a estrutura, interações e estequiometria das proteínas da cápside. Os componentes *major* da cápside são 240 trímeros da proteína II (hexão) que formam as faces e arestas do icosaedro, 12 pentâmeros do polipéptido III (pentão) principal componente dos vértices e 12 trímeros do polipéptido IV (fibra) que se projetam dos pentões (San Martín, 2012). Os hexões possuem ansas de regiões hipervariáveis (HVR) indutoras de anticorpos neutralizantes (determinante ϵ) e que conferem imunogenicidade específica de tipo. A região globular C-terminal da fibra interage com os recetores da célula hospedeira e é responsável por hemaglutinação *in vitro* (determinante γ), enquanto a sequência RGD (Arg-Gly-Asp) dos pentões se liga a integrinas na superfície da célula e induz a endocitose do virião (Berk, 2013; Echavarría, 2015; Russell, 2009). Alguns membros do género *Aviadenovirus*, HAdV-40 e -41 (espécie F humana [HAdV-F]), HAdV-52 (espécie HAdV-G) e vários adenovírus símios (SAdVs) possuem dois genes da fibra diferentes (Harrach, 2014).

As proteínas *minor* da cápside IIIa, VI, VIII e IX (a última só encontrada em *Mastadenovirus*), também designadas proteínas cimento, estabilizam as interações entre hexões consolidando a estrutura do virião. Estão organizadas em duas camadas distintas, IIIa e IX no exterior da cápside e VI e VIII internamente. As proteínas VI e VIII juntamente com a proteína V do *core* estabilizam os hexões peripentonais, enquanto as proteínas IIIa e IX formam uma rede hexagonal que rodeia os restantes hexões (Reddy & Nemerow, 2014).

No interior da cápside, juntamente com o DNA viral são encapsidadas mais seis proteínas: V, VII, μ ou X, IVa2, proteína terminal (TP) e protease viral p23. Os polipéptidos VII (proteína principal do *core*), V (exclusiva de *Mastadenovirus*) e X são fortemente básicos, ricos em arginina (Berk, 2013). A proteína VII está associada ao DNA contribuindo para a sua condensação (Mirza & Weber, 1982). Este complexo é revestido

pela proteína V que faz a ligação entre o *core* e a superfície interna da cápside através da interação com as proteínas VI e VIII (Reddy & Nemerow, 2014). A TP está ligada covalentemente à extremidade 5' das cadeias de DNA viral e funciona como *primer* para a sua síntese (King & van der Vliet, 1994). A proteína IVa2 liga-se à sequência de encapsidação no extremo esquerdo do genoma e medeia a encapsidação do DNA viral (Zhang & Imperiale, 2000). O *core* contém ainda a protease viral 23K que hidrolisa precursores de várias proteínas do virião durante a montagem e maturação da partícula viral e, ainda, na saída dos endossomas durante a entrada do vírus na célula (San Martín, 2012).

1.3. Estrutura e organização genómica

Os AdVs possuem um genoma de ácido desoxirribonucleico (DNA) de cadeia dupla (dsDNA) linear, de 26 a 48 quilopares de bases (kpb), cujo conteúdo em guanina (G) e citosina (C) varia entre 33,6 e 67,6% (Davison *et al.*, 2003; Harrach, 2014). O seu genoma caracteriza-se pela presença de repetições terminais invertidas (ITR) de tamanho variável (30-371 pares de bases [pb]), onde se situam as origens de replicação, e pela ligação covalente da TP ao extremo 5' das duas cadeias (Harrach, 2014).

O genoma viral codifica cerca de 40 proteínas distintas, algumas sob a forma de precursores (acompanhadas do prefixo “p”) que são processados proteoliticamente pela protease viral (Harrach *et al.*, 2011). De um modo geral, o genoma compreende genes homólogos, *i.e.* genes comuns a todos os AdVs, bem conservados dentro da família, localizados na porção central, e genes específicos de género, situados principalmente nas extremidades (Davison *et al.*, 2003; Harrach *et al.*, 2011). Foram identificados 16 genes comuns, presumindo-se que sejam provenientes de um ancestral comum, os quais incluem os genes da DNA polimerase (DNA-Pol), pTP e proteína de ligação a DNA viral de cadeia simples (DBP), envolvidas na replicação de DNA; os genes das proteínas 52/55K e IVa2, com funções na encapsidação do DNA viral; e, por fim, os genes das proteínas pIIIa, pentão, pVII, pX, pVI, hexão, protease, 100K, 33K, pVIII e fibra, envolvidas na formação e estrutura do virião (Davison *et al.*, 2003). Relativamente aos genes específicos de género, é relevante salientar que os genes das proteínas estruturais V e IX, E1A, E1B-19K e os genes das regiões E3 e E4 (com exceção de E4-34K) são exclusivos do género *Mastadenovirus*, assim como os genes de ácido ribonucleico (RNA)

VA (do inglês, *virus-associated RNA*) de *Mastadenovirus* e *Aviadenovirus* (genes não homólogos) (Davison *et al.*, 2003; Harrach, 2014). Um mapa genómico representativo da família *Adenoviridae* está apresentado na Figura 1.2.

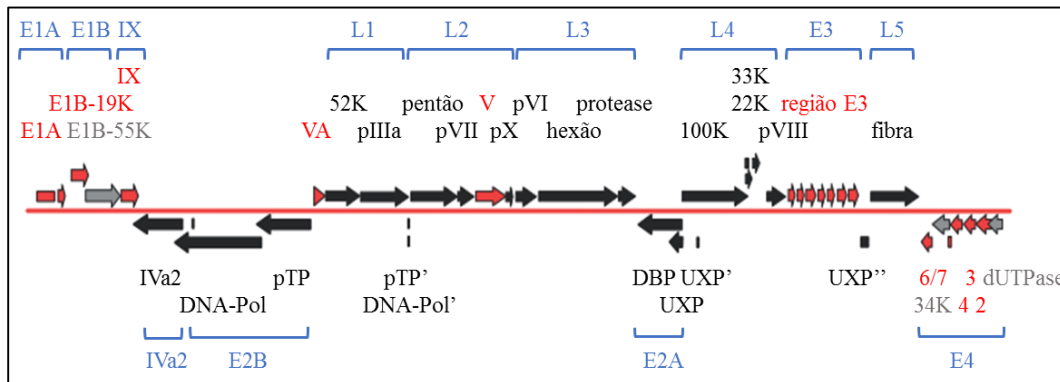


Figura 1.2 Esquema representativo do genoma do adenovírus humano C tipo 2. A linha contínua vermelha representa o genoma completo; as setas indicam a direção da transcrição dos diferentes genes, as pretas representam genes conservados entre géneros, as cinzentas genes presentes em mais do que um género e as vermelhas genes específicos do género *Mastadenovirus*; imediatamente acima ou abaixo das setas encontra-se a identificação do gene correspondente; a azul encontram-se apresentadas as respetivas unidades transcricionais. Adaptado de Harrach *et al.*, 2011.

Ambas as cadeias do DNA viral são transcritas e as unidades transcricionais genericamente designadas como precoces ou tardias, dependendo de serem expressas respetivamente antes ou depois da replicação do DNA viral. Nos *Mastadenovirus* existem cinco unidades transcricionais precoces (E1A, E1B, E2, E3 e E4) transcritas antes da replicação do DNA viral, quatro unidades transcricionais intermédias (IX, IVa2, L4 intermédia e E2 tardia) transcritas no início da replicação do DNA viral, e uma unidade transcricional tardia (*tardia major*) expressa após o início da replicação do DNA viral e que é processada em cinco famílias de RNA mensageiros (mRNAs) tardios, L1 a L5 (Berk, 2013). Todas as unidades são transcritas pela RNA polimerase II celular, à exceção dos genes VA que são transcritos pela RNA polimerase III (Harrach, 2014). De um modo geral, os genes dos AdVs dão origem a múltiplos mRNAs por *splicing* alternativo e, no caso das unidades transcricionais E2, E3 e *tardia major*, ainda pela utilização de locais de poliadenilação alternativos (Berk, 2013). Todos os mRNAs virais possuem *cap* 5' e são poliadenilados em 3' (Harrach, 2014).

A maioria das unidades de transcrição codificam proteínas com funções relacionadas, estratégia que tem como vantagem a utilização de um único elemento de controlo transcricional para regular a expressão de várias proteínas que são necessárias em simultâneo para uma determinada função. Assim, E1A codifica proteínas com atividade mitogénica na célula hospedeira e que estimulam a expressão de outros genes virais. E1B codifica as proteínas E1B-19K e E1B-55K que bloqueiam a apoptose dependente da p53 induzida pelos produtos de E1A (McConnell & Imperiale, 2004). E2 codifica as três proteínas que atuam diretamente na replicação do DNA (TP, DNA-Pol e DBP). E3 codifica diversos produtos que modulam a resposta imune do hospedeiro à infeção no sentido de proteger as células infetadas (Horwitz, 2004). IVa2 e pIX bem como a família de mRNAs tardios L1-L5 codificam elementos envolvidos na produção e montagem da cápside. E4 codifica um conjunto de proteínas, denominadas de acordo com a ordem pela qual surgem no genoma de 5' para 3' (E4orf1-7), com um conjunto de funções aparentemente diverso, correspondendo a produtos que medeiam a regulação da transcrição, *splicing* de RNA e tradução, transporte nuclear de mRNAs, síntese de DNA viral e apoptose (McConnell & Imperiale, 2004). Os genes VA codificam RNAs pequenos e altamente estruturados que, *inter alia*, inibem a ativação da resposta do interferão permitindo a tradução das proteínas virais (O'Malley *et al.*, 1986).

1.4. Ciclo replicativo

Tipicamente, a infeção natural por adenovírus humanos (HAdVs) resulta na replicação viral e lise das células epiteliais das mucosas da orofaringe, gastrointestinal ou da conjuntiva, seguida de infeção latente/persistente dos linfócitos da submucosa com produção intermitente de vírus (Murali *et al.*, 2014; Roy *et al.*, 2011). As linhas celulares contínuas do tipo epitelial (*e.g.* A549, HEK293, HeLa) são preferencialmente usadas para isolamento e propagação laboratorial dos HAdVs. O efeito citopático (CPE) característico observado nas culturas infetadas consiste em arredondamento e agregação das células e também na acumulação de inclusões nucleares basófilas. A Figura 1.3 resume o ciclo replicativo de AdVs.

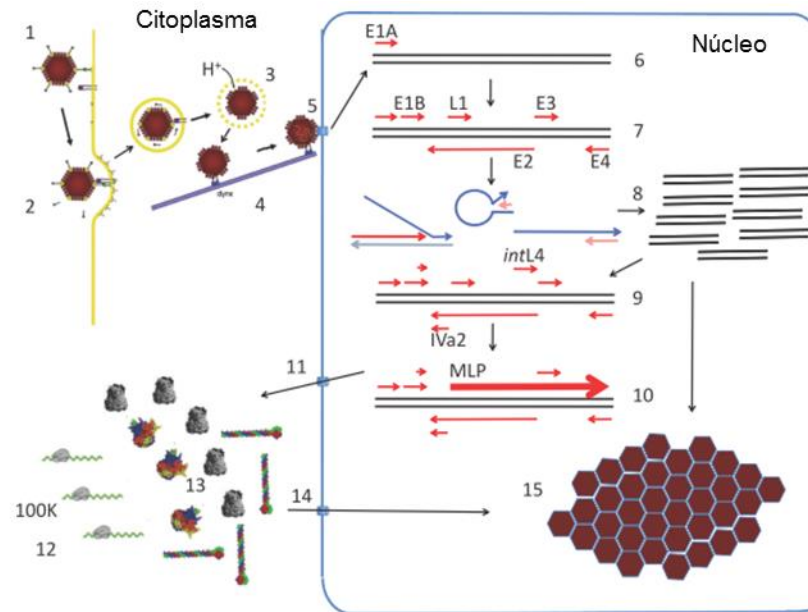


Figura 1.3 Ciclo replicativo de adenovírus. [1] A fibra liga-se ao recetor celular. [2] O pentão liga-se a integrinas, estimulando a endocitose do virião. As fibras dissociam-se do pentão. [3] A acidificação no endossoma estimula a libertação de pentões e hexões peripentonais. A partícula viral parcialmente descapsidada é libertada no citoplasma. [4] Transporte e [5] ligação ao complexo poro nuclear permite a entrada no núcleo do DNA viral associado à proteína VII. [6] Expressão dos genes E1A, estimulando a entrada da célula na fase S do ciclo celular e [7] ativação da transcrição das unidades E1B, E2, E3, E4 e L1. As proteínas resultantes combatem a resposta antiviral da célula e estimulam a síntese proteica. [8] As proteínas codificadas na região E2 replicam o DNA viral. [9] A replicação de DNA promove a transcrição das regiões IVa2 e L4 intermédia. [10] O promotor *major* tardio (MLP) é ativado e dá origem a múltiplos mRNAs que codificam as proteínas estruturais do virião e 100K. [11] Os mRNAs tardios são transportados para o citoplasma. [12] 100K estimula a inibição da tradução de mRNAs celulares. [13] Tradução de mRNAs virais em quantidades elevadas. [14] As proteínas são transportadas para o núcleo [15] onde ocorre a montagem da progênie viral, libertada por lise da célula. Adaptado de Berk, 2013.

Entrada na célula e transporte para o núcleo

Para a maioria dos AdVs, a primeira interação entre a partícula viral e a célula hospedeira é a ligação de alta afinidade do domínio globular da fibra ao recetor celular CAR (*Coxsackie virus and Adenovirus Receptor*) presente nas junções oclusivas (*tight junctions*) das células epiteliais de uma grande diversidade de tecidos (Roelvink *et al.*, 1998). Contudo, alguns HAdVs da espécie B usam como recetor primário a proteína reguladora do complemento CD46, enquanto HAdV-D usam CD46 ou ácido siálico, para além de uma série de recetores alternativos que têm vindo a ser descritos (Sharma *et al.*, 2009).

Uma segunda ligação, de afinidade mais baixa, é subsequentemente estabelecida entre o motivo RGD das ansas expostas do pentão e integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ da superfície celular (Stewart *et al.*, 1997). Esta ligação conduz à polimerização localizada de actina e estimulação da internalização do virião por endocitose mediada por clatrina (Nemerow & Stewart, 1999). Quando utilizada a molécula CD46 como recetor primário, a internalização ocorre por macropinocitose, mecanismo independente da clatrina (Kälin *et al.*, 2010).

A ligação a integrinas conduz ainda à alteração conformacional da base do pentão, com libertação da fibra ainda na superfície celular, iniciando-se um programa de descapsidação gradual que prossegue no compartimento endossómico com a libertação de pentões e hexões peripentonais e das proteínas IIIa, VI e VIII. A saída das partículas virais parcialmente desmontadas dos endossomas é mediada pelo fator lítico de membranas da proteína viral VI (Wiethoff & Nemerow, 2015). Estas subpartículas virais são transportadas por microtúbulos até à periferia nuclear, onde a proteína do hexão se liga à proteína Nup214 do poro nuclear, seguindo-se a desmontagem final da cápside e importação nuclear do DNA viral associado à proteína VII mediada por vários fatores celulares (Fay & Panté, 2015).

Transcrição e replicação de DNA viral

A expressão de genes precoces tem três objetivos principais: induzir a célula hospedeira a entrar na fase S do ciclo celular (genes E1A), com vista a obter os elementos necessários para a replicação viral; proteger a célula infetada contra a resposta antiviral do hospedeiro (genes E3); e a síntese de produtos de genes virais necessários para a replicação do genoma viral (genes E2) (Berk, 2013). A região E1A é a primeira a ser transcrita sendo também designada precoce imediata. Os produtos de E1A promovem a dissociação da proteína do retinoblastoma (Rb) do seu complexo com o fator de transcrição celular E2F e estimulam a transcrição das regiões E1B, E2, E3 e E4 dependente de E2F (Nemajerova *et al.*, 2008).

A acumulação de produtos do gene E2, *i.e.* pTP, DNA-Pol e DBP, permite a iniciação da replicação do DNA viral. O processo decorre em duas fases. Na primeira, a síntese de DNA inicia-se num extremo do genoma e decorre de forma contínua até ao outro, dando origem a uma molécula de cadeia dupla, constituída por uma cadeia mãe e uma cadeia

filha, e ainda uma cadeia mãe desemparelhada. Na segunda fase, é sintetizada a cadeia complementar da cadeia desemparelhada. O complexo de pré-iniciação é formado por DNA viral ligado às proteínas pTP, DNA-Pol e DBP, e a dois fatores de transcrição celulares (NFI e Oct-1) que, não sendo essenciais, potenciam a eficiência da iniciação da replicação. A primeira reação consiste na adição covalente de desoxicitidina monofosfato (dCMP) a um resíduo de serina da pTP (Ser580). A iniciação ocorre por emparelhamento com o resíduo guanosina na posição 4 do DNA matriz e síntese de um intermediário com trinucleótido (pTP-CAT). Este último recua três nucleótidos ficando emparelhado com os três primeiros resíduos, seguindo-se a sua elongação de que resulta uma cadeia filha. Na segunda fase do processo de replicação, a cadeia mãe simples circulariza devido ao emparelhamento dos extremos complementares e este fragmento de cadeia dupla, que inclui a origem de replicação, funciona como substrato para novos ciclos de replicação (Hoeben & Uil, 2013).

No início da síntese do DNA viral, a ativação do promotor *major* tardio (MLP) permite a expressão eficiente dos genes das proteínas estruturais e de 100K, envolvida na regulação da tradução e montagem do virião. Durante a fase precoce de infeção, o MLP está ativo, mas apenas a proteína L1-52/55K é sintetizada (Berk, 2013). A ativação tardia de MLP depende das proteínas IVa2 e L4-22K. IVa2 é transcrita numa fase intermédia tal como L4-22K, esta última a partir do promotor L4 e independente de MLP (Morris *et al.*, 2010). Após poliadenilação, os transcritos tardios sofrem *splicing* originando mRNAs com uma sequência líder tripartida não traduzida. A interação entre esta, L4-100K e o fator de iniciação eIF4G resulta na tradução seletiva dos mRNAs virais tardios (Xi *et al.*, 2005).

Morfogénese e saída do virião

A replicação do DNA viral e a síntese de grandes quantidades de proteínas estruturais antecede a montagem dos novos vírus. A produção dos capsómeros (hexão, pentão e fibra) ocorre no citoplasma sendo subsequentemente importados para o núcleo onde decorre o processo de montagem. O DNA viral é seletivamente encapsidado em procápsides preformadas, de forma polarizada, através do reconhecimento da sequência de encapsidação, localizada perto do extremo esquerdo do genoma, pela proteína IVa2 e subsequente recrutamento de um conjunto de proteínas (L4-22K, L1-52/55K, L4-33K e

IIIa) (Saha *et al.*, 2014). A proteína VII na sua forma precursora (pVII) associa-se ao DNA viral ao interagir com IVa2 e L1-52/55K. Aparentemente, IVa2, localizada num único vértice, funciona como motor dependente de ATPase que empurra o DNA para o interior da cápside (Ahi *et al.*, 2013). A protease viral liga-se então inespecificamente ao DNA viral e corta um fragmento C-terminal de pVI (pVIc), formando um complexo proteolítico ativado (DNA-protease-pVIc) responsável pelo processamento dos precursores das proteínas IIIa, VI, VII, VIII, μ e TP e de L1-52/55K (Graziano *et al.*, 2013). Esta última, presente nas cápsides vazias mas ausente nos viriões maduros, necessita de processamento proteolítico para ser removida (Pérez-Berná *et al.*, 2014). A maturação proteolítica dos viriões imaturos é necessária para produzir partículas infecciosas suscetíveis de serem descapsidadas numa infeção posterior. A libertação da progénie viral ocorre por lise da célula infetada, mediada pela proteína E3-11.6K, codificada pela região precoce E3 mas abundantemente expressa durante a fase tardia a partir de MLP, e também referida como proteína da morte (Murali *et al.*, 2014).

1.5. Classificação e diversidade genética

Os AdVs constituem a família *Adenoviridae* (nível taxonómico mais elevado estabelecido) e integram vírus isolados a partir de vertebrados. Quando da análise filogenética de sequências genómicas completas são claramente identificadas cinco linhagens distintas correspondentes aos cinco géneros em que a família se divide. O género *Aviadenovirus* é composto por vírus isolados apenas a partir de aves e compreende 8 espécies, enquanto o género *Mastadenovirus* inclui isolados exclusivamente de mamíferos e, atualmente, abrange 25 espécies estabelecidas. O género *Ichtadenovirus*, o mais recentemente aprovado, compreende uma única espécie isolada de esturção-branco. Os géneros *Atadenovirus* e *Siadenovirus*, com 5 espécies cada, contêm vírus encontrados em hospedeiros muito díspares (*e.g.* répteis, aves e mamíferos), o nome do primeiro reflete o elevado teor de adenina e timina (A+T) do genoma dos primeiros elementos estudados, enquanto o do segundo se deve à potencial sialidase codificada (Harrach, 2014). Para além dos cinco géneros oficialmente aprovados pelo Comité Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (Harrach *et al.*, 2011), recentemente, na sequência da caracterização parcial do genoma de novos AdVs descobertos em quatro espécies de tartarugas da superfamília Testudinoidea (Dospoly *et al.*, 2013), foi proposta a criação

de um sexto género denominado *Testadenovirus* com 3 espécies candidatas (Harrach, 2014).

Os critérios para a criação de uma nova espécie são vários. Contudo, a distância filogenética (> 5-15% de divergência) da sequência de aminoácidos da DNA-Pol é o critério considerado mais importante, a que se pode juntar diferenças na organização genómica (especialmente da região E3), composição nucleotídica (G+C%), oncogenicidade em roedores, seroneutralização cruzada, capacidade de recombinação, número de genes VA RNA, gama de hospedeiros e características de hemaglutinação, sendo expectável que estas outras características sejam concordantes com os resultados obtidos pela análise das relações filogenéticas. As espécies são designadas com referência ao primeiro hospedeiro onde foram descritas, seguido do género em que se incluem e de uma letra do alfabeto (Harrach, 2014). As espécies englobam tipos, indicados por números árabes, anteriormente designados serotipos uma vez que eram diferenciados por neutralização com anticorpos dirigidos contra o determinate ϵ localizado nas ansas HVR do hexão (Berk, 2013; Echavarría, 2015; Russell, 2009; Wold & Ison, 2013). Por razões técnicas e económicas, a serotipagem tem vindo a ser substituída por tipagem filogenética através da análise de sequências do gene da proteína do hexão (Aoki *et al.*, 2011; Ebner *et al.*, 2005; Madisch *et al.*, 2005). No entanto, ainda não existe consenso relativamente aos critérios para criação de um “novo” tipo. Alguns autores consideram que a caracterização deve basear-se na análise da sequência genómica completa (Seto *et al.*, 2011). Uma vez que a maioria dos laboratórios não possui recursos que permitam sequenciar genomas completos em grande número de amostras, qualquer sistema de tipagem filogenética prático deverá indicar os genes específicos a serem usados para definir um novo tipo, assim como o grau de divergência acima do qual é reconhecido o novo tipo.

O género *Mastadenovirus* inclui todos os AdVs de primatas conhecidos até ao momento. Segundo o ICTV, são reconhecidos 54 tipos de HAdVs que estão classificados em 7 espécies denominadas de A a G (*human mastadenovirus* A-G) (Harrach *et al.*, 2011; Harrach, 2014). Porém, o número de tipos distintos com origem humana existentes na literatura estende-se a pelo menos 71. É de salientar que o HAdV-52 foi o primeiro a ser classificado com base na análise filogenética do genoma completo, sendo os tipos que

surgiram subsequentemente classificados em função do mesmo critério (Lion, 2014), alguns foram alvo de publicação outros são encontrados apenas no *GenBank*.

No que respeita a espécies de SAdVs, o ICTV reconhece a existência de uma espécie, *simian mastadenovirus A* (SAdV-A), que engloba 7 tipos (Harrach *et al.*, 2011; Harrach, 2014). Porém, nos últimos anos, têm sido obtidas sequências genómicas completas de SAdVs anteriormente isolados e identificados e caracterizados inúmeros novos AdVs a partir de PNH em cativeiro e no seu habitat natural (Bányai *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Chiu *et al.*, 2013; Foytich *et al.*, 2014; Gál *et al.*, 2013; Hall *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2011; Malouli *et al.*, 2014; Maluquer de Motes *et al.*, 2011; Pantó *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2009, 2012; Seimon *et al.*, 2015; Tong *et al.*, 2010; Wevers *et al.*, 2010, 2011; Zhou *et al.*, 2014). Esta enorme quantidade de informação determinou que alguns autores já considerem a existência de uma segunda espécie, SAdV-B (Chiu *et al.*, 2013; Foytich *et al.*, 2014; Malouli *et al.*, 2014; Roy *et al.*, 2012), constituída inicialmente por membros isolados a partir de amostras fecais de macacos assintomáticos em cativeiro (Roy *et al.*, 2009) e até mesmo uma terceira, SAdV-C (Malouli *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014), com origem em membros isolados a partir de zaragatoas nasais de babuínos sintomáticos e assintomáticos durante um surto de doença respiratória aguda na colónia onde estavam inseridos (Chiu *et al.*, 2013). Recentemente, o grupo de estudo da família *Adenoviridae* do ICTV apresentou uma proposta para a criação destas duas últimas espécies, a qual aguarda avaliação do comité executivo (Podgorski & Harrach, 2015). Muito recentemente, Pantó e colaboradores (2015) desenvolveram um trabalho muito relevante neste contexto, consolidando alguma da classificação instituída e propondo a criação de 4 novas espécies de SAdVs apenas com base nas sequências de 4 regiões distintas do genoma de vírus identificados em macacos do Velho Mundo (MVM). A Tabela 1.1 apresenta os AdVs de primatas identificados e/ou classificados até ao momento. Curiosamente, um grande número de AdVs identificados em PNH está estreitamente relacionado em termos filogenéticos com estirpes humanas, sendo por isso classificados como espécies humanas e a sua origem símia determinada pela espécie do hospedeiro de onde foram isolados. Contrariamente, outros SAdVs com base na análise de sequências genómicas surgem claramente distintos dos HAdVs. Na Tabela 1.1 é possível observar espécies de HAdVs (*e.g.* D e A) com um número muito reduzido de elementos símios e todos os outros humanos; espécies de HAdVs (*e.g.* B e C) com um número relativamente

elevado de SAdVs; espécies de HAdVs (*e.g.* E e G) com um número muito reduzido de isolados humanos e todos os outros elementos de origem símia; espécies de SAdVs (*e.g.* A e B) sem quaisquer membros humanos; e, ainda, uma série de vírus símios que aguardam classificação.

Tabela 1.1 Listagem de adenovírus humanos e símios identificados com base na informação contida em Abbink *et al.*, 2015; Berk, 2013; Harrach *et al.*, 2011; Harrach, 2014; Lion, 2014; Pantó *et al.*, 2015; Podgorski & Harrach, 2015; Robinson *et al.*, 2013; Wevers *et al.*, 2011; Wold & Ison, 2013.

Espécie	Tipo	
	Adenovírus humanos (HAdVs)	Adenovírus símios (SAdVs)
<i>Human mastadenovirus A</i>	12, 18, 31, 61	SAdV-ch1, PtroAdV-8 [#]
<i>Human mastadenovirus B</i>	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55, 66, 68	21, 27, 28, 29, 32, 33, 35, 41, 46, 47, GgorAdV-B7 [#] , GgorAdV-2 [#] , GgorAdV-3 [#] , GgorAdV-4 [#] , GgorAdV-5 [#] , PtroAdV-7 [#]
<i>Human mastadenovirus C</i>	1, 2, 5, 6, 57	31, 34, 40, 42, 43, 44, 45, GgorAdV-6 [#] , PtroAdV-4 [#] , PtroAdV-6 [#] , PtroAdV-9 [#]
<i>Human mastadenovirus D</i>	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 53, 54, 56, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 67, 69, 70, 71	PtroAdV-10 [#]
<i>Human mastadenovirus E</i>	4	22, 23, 24, 25, 26, 30, 36, 37, 38, 39, Chimp Ad Y25, PtroAdV-1 [#] , PtroAdV-5 [#] , PtroAdV-11 [#] , PtroAdV-12 [#] , PtroAdV-13 [#] , PtroAdV-14 [#]
<i>Human mastadenovirus F</i>	40, 41	GgorAdV-1 [#] , PtroAdV-3 [#]
<i>Human mastadenovirus G</i>	52	1, 2, 7, 11, 12, 15, 33, RhAdV-51, RhAdV-52, RhAdV-53, MmulAdV-1 [#] , MfasAdV-1 [#]
<i>Simian mastadenovirus A</i>		3, 4, 6, 9, 10, 14, 48, PtroAdV-2 [#]
<i>Simian mastadenovirus B*</i>		5, 8, 49, 50, A1173, A1258, A1285, A1139, A1163, A1327, A1335, A1296, A1312, BaAdV-1
<i>Simian mastadenovirus C*</i>		19, BaAdV-2, BaAdV-3
<i>Simian mastadenovirus D[§]</i>		13
<i>Simian mastadenovirus E[§]</i>		16

<i>Simian mastadenovirus F</i> [§]	17, 18
<i>Simian mastadenovirus G</i> [§]	20
Sem classificação	TMAV, 23334, CgueAdV-1 [#] , CgueAdV-2 [#] , CgueAdV-3 [#] , PhamAdV-1 [#] , PbadAdV-1 [#] , PbadAdV-2 [#] , PbadAdV-3 [#]

* Aguarda aprovação do Comité Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV).

§ Proposto em Pantó *et al.*, 2015.

Com base apenas na sequência de hexão.

O grau de complexidade na classificação e nomenclatura dos AdVs é ainda aumentado pela diversidade genética gerada por eventos de recombinação. Co-infecções, concomitantes ou sequenciais, com AdVs distintos são frequentemente observadas, propiciando as condições para a ocorrência de recombinação homóloga entre genomas diferentes. Este fenómeno é reconhecido como um dos principais criadores de diversidade em AdVs, ocorrendo frequentemente troca de segmentos de genes codificadores das proteínas do hexão, pentão e fibra entre tipos da mesma espécie (Lukashev *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2009). Está igualmente documentada evidência de recombinação genómica entre tipos de espécies distintas de HAdVs (Ebner *et al.*, 2005) e, ainda mais relevante neste contexto, entre tipos de SAdVs e HAdVs. A análise computacional de HAdV-4, o único membro humano da espécie HAdV-E, revelou tratar-se de um genoma de SAdV-26 (espécie HAdV-E) com inserção de ansas HVR da proteína do hexão de HAdV-16 (espécie HAdV-B) e presença do local de ligação para o fator de transcrição NFI do hospedeiro humano, conservado em HAdVs mas ausente em SAdVs, sendo o resultado de um evento de recombinação entre espécies de AdVs e transferência lateral de genes de um AdV de chimpanzé (Dehghan *et al.*, 2013b). De modo semelhante, a análise de SAdV-35 revelou que, para além do seu genoma partilhar grandes porções com SAdV-21 e SAdV-27, contém os genes do pentão e do hexão de HAdV-21 e parte do gene fibra de HAdV-16, todos membros da espécie HAdV-B, e também a existência do local de ligação de NFI (Dehghan *et al.*, 2013a). Outro exemplo diz respeito ao vírus símio SAdV-ch1, isolado de um chimpanzé em cativeiro, cuja sequência parcial do hexão surge inserida no isolado humano HAdV-61, dando origem ao HAdV-31, todos classificados como AdVs da espécie HAdV-A (Zhou *et al.*, 2014). Alguns autores têm expressado preocupação relativamente à continuação da utilização da numeração arábica sequencial para designar novos tipos devido à previsão de grande aumento do seu número,

em grande parte devido à descoberta do número crescente de recombinantes (Aoki *et al.*, 2011). No entanto, enquanto não houver definição dos genes a usar na tipagem, a sequenciação do genoma completo manter-se-á como a forma de descrever novos tipos e genomas recombinantes, e novos números surgirão.

1.6. Gama de hospedeiros e doença

Os AdVs infetam uma larga gama de hospedeiros vertebrados, desde peixes até ao Homem, e, classicamente, é assumido que a gama de hospedeiros naturais de cada tipo de AdVs se encontra restrita a uma única espécie ou a espécies estreitamente relacionadas (Harrach *et al.*, 2011). Esta afirmação fundamenta-se na semelhança entre as árvores filogenéticas da protease viral e do RNA ribossomal (rRNA) da subunidade pequena (12S) dos ribossomas mitocondriais do hospedeiro, levando à conclusão que os AdVs largamente co-especiaram com grandes classes de hospedeiros vertebrados (Benkö & Harrach, 2003).

Porém, nos últimos anos surgiram várias evidências que apoiam potenciais eventos de transmissão de AdVs entre diferentes espécies de hospedeiros, designadamente entre primatas. Estudos de vigilância serológica evidenciaram a presença de anticorpos neutralizantes contra AdVs de chimpanzé em humanos e em macacos do Novo Mundo (MNM); por outro lado, também foram encontrados anticorpos neutralizantes contra HAdVs em chimpanzés e em MNM (Ersching *et al.*, 2010; Xiang *et al.*, 2006).

Para além destes estudos de larga escala, estão ainda documentados pelo menos dois casos de transmissão interespecífica. Um relativo a um surto de pneumonia fulminante em macacos-titi, em que se registou também infeção respiratória de um investigador e de um familiar sem qualquer contato com macacos, com posterior deteção de anticorpos neutralizantes contra este vírus (Chen *et al.*, 2011). Para averiguar o potencial de transmissão entre espécies do AdV envolvido no surto em macacos-titi, os autores infetaram experimentalmente membros de outra espécie de MNM (saguim-de-tufos-brancos) que desenvolveram doença respiratória acompanhada pelo aumento do título de anticorpos específicos contra o vírus (Yu *et al.*, 2013). O outro caso diz respeito a um surto de doença respiratória aguda por AdVs numa colónia de babuínos e subsequente deteção de anticorpos neutralizantes nos seus tratadores (Chiu *et al.*, 2013).

Outra evidência que suporta indiretamente a transmissão interespecífica de AdVs está relacionada com a classificação dos AdVs de proveniência símia como AdVs “humanos”. Neste contexto, existem dois exemplos extremos muito curiosos. O HAdV-52 é o único membro com origem humana da espécie HAdV-G, surgindo nas árvores filogenéticas acompanhado de vários AdVs estreitamente relacionados, todos de origem símia. HAdV-52 foi isolado a partir de cinco amostras de fezes humanas durante um surto de gastroenterite e apresenta elevada similaridade com o SAdV-1 isolado de macaco cinomólogo (Jones II *et al.*, 2007), colocando a questão se os indivíduos poderão ter sido infectados por um AdV de origem símia. De modo similar, HAdV-4 da espécie HAdV-E, igualmente único membro de origem humana dentro da respetiva espécie, é um importante agente patogénico ocular e respiratório, altamente contagioso, constituído por um genoma recombinante em 97% similar ao SAdV-26, sendo colocada a hipótese de transmissão zoonótica com ligeiras alterações genómicas no processo de adaptação ao novo hospedeiro (Dehghan *et al.*, 2013b). Ainda, de um modo geral, os AdVs isolados de grandes símios têm sido filogeneticamente classificados nas espécies HAdV-B, -C e -E (Colloca *et al.*, 2012; Hoppe *et al.*, 2015a; McVey *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2009; Seimon *et al.*, 2015; Tong *et al.*, 2010; Wevers *et al.*, 2010, 2011), enquanto alguns SAdVs descobertos a partir de MVM têm sido incluídos na espécie HAdV-G (Abbink *et al.*, 2015; Bányai *et al.*, 2010; Foytich *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2011; Wevers *et al.*, 2011). Todavia, ainda que em número muito reduzido, estão também documentadas deteções de AdVs em grandes símios que se encontram potencialmente classificados nas espécies HAdV-A, -D e -F e na espécie SAdV-A (Hoppe *et al.*, 2015a; Tong *et al.*, 2010; Wevers *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2014). É importante referir que AdVs de gibões ainda não foram descritos e só muito recentemente foram detetados AdVs em prossímios (Zohdy *et al.*, 2015).

Os AdVs são considerados agentes infecciosos ubíquos, muito resistentes às condições ambientais e facilmente transmitidos pelas vias fecal-oral e respiratória. São resistentes a secreções gástricas e biliares, podendo ser excretados em grande quantidade nas fezes. No Homem, podem causar uma variedade de patologias frequentemente com um curso clínico ligeiro e de resolução espontânea. No entanto, em indivíduos imunocomprometidos, especialmente transplantados, a doença pode ter uma progressão grave e mesmo fatal (Lion, 2014). Normalmente, o vírus infeta e replica-se nas mucosas

do trato respiratório, olho, bexiga e trato gastrointestinal, causando doença respiratória aguda, conjuntivite, cistite ou gastroenterite. Tem sido estabelecida uma associação entre a espécie/tipo de AdVs e o tropismo de tecidos. De modo geral, as espécies HAdV-A e -C são responsáveis por infecções respiratórias, urinárias e gastrointestinais; HAdV-B provocam infecções respiratórias, oculares, urinárias e gastrointestinais; HAdV-D estão implicados em infecções oculares e gastrointestinais; HAdV-E originam infecções oculares e respiratórias; e, por fim, HAdV-F e -G estão associados a gastroenterite (Wold & Ison, 2013).

Relativamente às patologias causadas por AdVs em PNH a informação disponível é limitada. Uma vez que são libertados persistentemente do trato gastrointestinal de primatas, a maioria dos estudos tem-se focado na pesquisa e identificação de AdVs em PNH assintomáticos (Lu *et al.*, 2011; Maluquer de Motes *et al.*, 2011; McVey *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2009, 2012; Seimon *et al.*, 2015; Wevers *et al.*, 2011; Zohdy *et al.*, 2015). No entanto, estão documentados alguns quadros clínicos de doenças respiratórias e gastrointestinais provavelmente provocados por AdVs com diversos níveis de gravidade. GgorAdV-B7 foi originalmente encontrado num grupo de gorilas num jardim zoológico na Alemanha com diarreia prolongada e infeção respiratória de resolução espontânea (Wevers *et al.*, 2010). O AdV macaco-titi (TMAdV) foi isolado a partir de tecido pulmonar na sequência de um surto de hepatite e pneumonia fulminante numa colónia de macacos-titi, cativos num centro de investigação na Califórnia (Estados Unidos da América, E.U.A.) que, pela gravidade do seu estado de saúde, obrigou à eutanásia de 83% dos animais afetados (Chen *et al.*, 2011). Um surto de doença respiratória aguda em babuínos num centro de investigação no Texas (E.U.A.) foi associado a infeção por AdVs, com morte de 2 dos 4 animais doentes devido a pneumonia e isolamento do vírus a partir de secreções nasais (Chiu *et al.*, 2013). Na sequência da morte de um saguim-leãozinho cativo num jardim zoológico na Hungria, que apresentava sintomas respiratórios graves, foi detetada a presença e isolado mais um novo AdV (Gál *et al.*, 2013).

Apesar de não ter sido possível estabelecer o papel como agente etiológico, foram detetados AdVs em amostras fecais de MVM com diarreia num centro de primatas na China (Bányai *et al.*, 2010). Um saguim-cabeça-de-algodão, propriedade de um particular, com doença respiratória e gastrointestinal levou à identificação de um novo AdV (Hall *et al.*, 2012). Dois novos tipos de AdVs foram encontrados em amostras fecais

de chimpanzés em liberdade, na Tanzânia, com doença respiratória superior aguda, mas sem que o papel destes vírus como agentes etiológicos tenha sido claramente estabelecido (Tong *et al.*, 2010).

1.7. Adenovírus como vetores de vacinação, terapia génica e oncoterapia

Apesar da importância dos AdVs como agentes patogénicos para o Homem e animais, estes são também largamente utilizados como ferramentas biomédicas e daí o ressurgimento do interesse por estes vírus nos últimos anos. A maioria dos ensaios diz respeito ao uso de vetores de AdVs em oncoterapia, mas também incluem AdVs como vetores de vacinas e terapia génica (Wold & Toth, 2013). Até julho de 2015, mais de 500 ensaios de terapia génica estão ou estiveram a ser conduzidos com vetores de AdVs, totalizando cerca de 22% dos ensaios clínicos de terapia génica (Edelstein, 2015).

A utilização de vetores de AdVs apresenta múltiplas vantagens, nomeadamente o facto da biologia do vírus se encontrar bem estudada, a sua replicação permitir a produção de *stocks* estáveis de títulos elevados, infetarem diversos tipos de tecidos e células, em divisão ou não, e não se integrarem no genoma do hospedeiro (Bangari & Mittal, 2006; Wold & Ison, 2013; Wold & Toth, 2013). Enquanto vetores, os AdVs podem ser classificados em dois tipos: de replicação defetiva (RD), que possibilitam a entrega/expressão de genes heterólogos à célula alvo, ou de replicação competente (RC), cujo mecanismo se baseia na replicação na célula alvo. Os primeiros são modificados pela remoção de genes essenciais, existindo diversas variações na extensão das deleções, que levam à sua categorização em primeira geração, segunda geração e *helper-dependent*. Por sua vez, os vetores RC têm características oncolíticas e, portanto, têm sido estudados intensivamente como terapêutica para o cancro (McConnell & Imperiale, 2004; Wold & Toth, 2013).

Os AdVs são altamente imunogénicos, induzindo respostas imunitárias inata e adaptativa (celular e humoral) intensas (Bangari & Mittal, 2006; McConnell & Imperiale, 2004; Wold & Ison, 2013; Wold & Toth, 2013). Assim, vacinas que empregam os AdVs como vetores têm sido amplamente testadas na indução de imunidade contra vários agentes patogénicos, entre os quais HIV, plasmódio, vírus da gripe, vírus da hepatite C (HCV) e micobactérias (Barouch, 2010; Hosseini *et al.*, 2012; Schuldt & Amalfitano, 2012; Smaill *et al.*, 2013; Xiang *et al.*, 2015). Mais especificamente, vetores de AdVs

baseados no HAdV-5 têm sido os mais utilizados devido ao seu amplo tropismo tecidual, produção a preços acessíveis e indução de respostas imunitárias potentes comparativamente com outros vetores (Barouch, 2010; Colloca *et al.*, 2012). Porém, a pré-existência nas populações humanas de imunidade anti-HAdVs em geral, e especificamente anti-HAdV-5, consequência da infecção natural ao longo da vida, pode comprometer a eficácia de tais vetores (McElrath *et al.*, 2008; Priddy *et al.*, 2008), para além de potencialmente comprometer a segurança da sua administração (Colloca *et al.*, 2012). Como alternativa, foram avaliados outros tipos de HAdVs menos comuns, intitulados “tipos raros”, como HAdV-6, -11, -24, -26, -34 ou -35, pois apresentam baixa seroprevalência em humanos. Contudo, o êxito de tais vetores não está apenas dependente da ausência de anticorpos neutralizantes, mas também do seu grau de imunogenicidade, o qual se revelou substancialmente mais reduzido em modelos animais (Colloca *et al.*, 2012). Adicionalmente, a presença de anticorpos neutralizantes varia em função da localização geográfica, existindo títulos mais elevados contra os HAdV-5, -6, -26 e -36 em locais fora da Europa e E.U.A. (Mast *et al.*, 2010). Assim, estratégias de vacinação que utilizem vetores de HAdVs contra infecções como a malária ou pelo HIV poderão ter uma eficácia reduzida nas regiões onde são mais necessárias por estas apresentarem elevada seroprevalência para HAdVs. Consequentemente, a utilização de HAdVs em vetores tem suscitado bastante preocupação.

Para contornar este problema, AdVs de animais têm sido utilizados como alternativa aos humanos (Bangari & Mittal, 2006; Lopez-Gordo *et al.*, 2014). Naturalmente, os SAdVs surgiram como potencial alternativa, tendo já sido desenvolvidos múltiplos vetores baseados em AdVs de chimpanzé (Dicks *et al.*, 2012; O’Hara *et al.*, 2012). Avaliações da presença de anticorpos neutralizantes contra alguns AdVs de chimpanzé em populações humanas têm revelado atividade neutralizante baixa ou rara. Paralelamente, estes vírus apresentam indicadores de imunogenicidade comparáveis aos vetores de HAdV-5 (Capone *et al.*, 2013; Colloca *et al.*, 2012). A potência e longevidade da imunidade adaptativa induzida e a sua comprovada eficácia em modelos animais tornou estes vetores candidatos bastante promissores para o desenvolvimento de vacinas contra diversas doenças infecciosas (Capone *et al.*, 2013). Ensaios clínicos com vetores de AdVs de chimpanzé incluem vacinas para a malária e infecções por HCV e vírus da gripe (Antrobus *et al.*, 2014; Barnes *et al.*, 2012; O’Hara *et al.*, 2012). Apesar dos AdVs de

grandes símios serem preferidos por estes pertencerem à mesma família de hospedeiros dos seres humanos, AdVs com origem em MVM também estão a ser considerados. Recentemente, a construção e avaliação de vetores derivados de AdVs de macacos *rhesus* demonstraram resultados promissores, podendo os vírus utilizados representar uma nova classe de vacinas (Abbink *et al.*, 2015). Estes vírus poderão oferecer vantagens únicas inerentes ao facto de não terem hospedeiros tão estreitamente relacionados com o Homem e apresentarem seroprevalências mais baixas nas populações humanas, mas com manutenção das características de replicação e estrutura genómica que permitam utilizar as ferramentas tecnológicas desenvolvidas para os AdVs humanos ou de chimpanzé.

1.8. Objetivos

Nos últimos anos, o desenvolvimento de vetores de SAdVs levou à sequenciação de genomas de vírus anteriormente isolados e incompletamente analisados, bem como à descoberta e caracterização de novos SAdVs, com consequente incremento significativo do número de sequências nucleotídicas para estes vírus disponível nas bases de dados. A análise desta informação revelou uma grande diversidade genética e o estreito relacionamento filogenético dos SAdVs com HAdVs. A compreensão da complexidade dos AdVs dos primatas e da sua história evolutiva, possível utilização como vetores e capacidade de transmissão interespecífica, incluindo potencial zoonótico, aliadas ao facto de haver espécies de símios para as quais não foram descritos AdVs ou apenas um número reduzido, levaram-nos a estabelecer como objetivos gerais deste estudo isolar, identificar e caracterizar parcialmente AdVs presentes em amostras fecais de PNH em cativeiro no Jardim Zoológico de Lisboa.

Para dar resposta aos objetivos gerais apresentados, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Colher amostras fecais representativas de todas as espécies de PNH do Jardim Zoológico de Lisboa;
- Detetar AdVs diretamente nestas amostras através da amplificação por *nested*-PCR de regiões genómicas conservadas (sequências codificadoras parciais das proteínas do hexão e DNA-Pol);
- Sequenciar os amplicões obtidos e confirmar por BLAST a natureza viral das sequências produzidas;

- Analisar as relações filogenéticas dos AdVs detetados, entre si e com AdVs de primatas para os quais existem sequências depositadas nas bases de dados, através da construção de árvores filogenéticas e a sua classificação tentativa ao nível da espécie;
- Isolar em culturas celulares os AdVs detetados.

2. Material e Métodos

2. Material e Métodos

2.1. População de primatas não humanos e amostragem

O presente estudo teve como população alvo primatas não humanos (PNH). Para o efeito, o Jardim Zoológico de Lisboa cedeu gentilmente amostras de fezes de PNH cativos no parque. As amostras foram colhidas entre Outubro de 2014 e Janeiro de 2015 por veterinários e/ou tratadores de animais do mesmo. Tendo em conta a origem e a natureza do produto biológico utilizado neste estudo, não se colocam questões relacionadas com bioética.

Foram colhidas, no total, 128 amostras de fezes de 34 espécies distintas que abrangem as famílias Lemnidae (subordem Strepsirrhini, infraordem Lemniformes); Cebidae e Ateidae (macacos do Novo Mundo [MNM]) (subordem Haplorrhini, infraordem Simiiformes, parvordem Platyrrhini); Cercopithecidae (macacos do Velho Mundo [MVM]), Hylobatidae (gibões) e Hominidae (grandes símios) (subordem Haplorrhini, infraordem Simiiformes, parvordem Catarrhini) (Pecon-Slattey, 2014). As amostras tiveram origem maioritariamente em macacos do Velho Mundo (37,5%; 48/128) e do Novo Mundo (31,3%; 40/128), seguido de grandes símios (13,3%; 17/128) e lémures (13,3%; 17/128), e gibões (4,7%; 6/128) (Figura 2.1). A Tabela 2.1 descreve as espécies de primatas incluídas no estudo e o número das respetivas amostras. Estas foram colhidas de animais isolados ou em coabitação. Neste caso, quando existiam no recinto menos de 5 animais colheu-se um número de amostras fecais igual ao número de animais, para 5 a 10 animais colheram-se 5 amostras e para mais de 10 animais colheram-se 10 amostras.

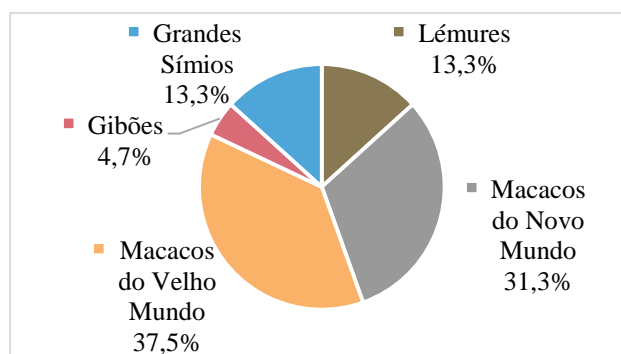


Figura 2.1 Representação gráfica da distribuição da amostra de primatas não humanos em função do grupo a que pertencem.

Tabela 2.1 Descrição da amostra de primatas não humanos em estudo.

	Primata		Número de amostras
	Nome comum	Nome científico*	
Lémures	Lémure-de-fronte-branca	<i>Eulemur albifrons</i>	2
	Lémure-preto	<i>Eulemur macaco macaco</i>	4
	Lémure-de-cauda-anelada	<i>Lemur catta</i>	5
	Lémure-vermelho	<i>Varecia variegata rubra</i>	1
	Lémure-preto-e-branco-de-colar	<i>Varecia variegata variegata</i>	5
Macacos do Novo Mundo	Macaco-uiivador-preto	<i>Alouatta caraya</i>	2
	Macaco-aranha-da-Colômbia	<i>Ateles fusciceps rufiventris</i>	5
	Macaco-de-Goeldi	<i>Callimico goeldii</i>	4
	Saguim-de-face-branca	<i>Callithrix geoffroyi</i>	1
	Saguim-comum	<i>Callithrix jacchus</i>	2
	Mico-leão-de-juba-dourada	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	1
	Mico-leão-dourado	<i>Leontopithecus rosalia</i>	3
	Saguim-bicolor	<i>Saguinus bicolor</i>	2
	Saguim-imperador	<i>Saguinus imperator subgriseus</i>	2
	Saguim-de-mãos-douradas	<i>Saguinus midas</i>	2
	Saguim-cabeça-de-algodão	<i>Saguinus Oedipus</i>	2
	Saimiri-da-Bolívia	<i>Saimiri boliviensis</i>	5
	Macaco-fidalguinho	<i>Sapajus apella</i>	3
	Macaco-capuchinho-de-peito-amarelo	<i>Sapajus xanthosternus</i>	5
	Indeterminada [#]	<i>Indeterminada</i>	1
Macacos do Velho Mundo	Macaco-de-nariz-branco	<i>Cercopithecus ascanius</i>	4
	Macaco-de-beiço-branco	<i>Cercopithecus cephus</i>	1
	Macaco-Diana	<i>Cercopithecus diana</i>	2
	Macaco-de-Brazza	<i>Cercopithecus neglectus</i>	5
	Macaco-testiverde	<i>Chlorocebus cynosuros</i>	1
	Colobo-guereza-kikuyu	<i>Colobus guereza kikuyuensis</i>	5
	Macaco-do-Japão	<i>Macaca fuscata</i>	10
	Macaco-cauda-de-leão	<i>Macaca silenus</i>	5
	Babuíno-hamadrias	<i>Papio hamadryas</i>	10
	Langur-de-Java	<i>Trachypithecus auratus auratus</i>	5
Gibões	Gibão-de-mãos-brancas	<i>Hylobates lar</i>	4
	Siamango	<i>Symphalangus syndactylus</i>	2
Grandes Símios	Gorila-ocidental-das-terras-baixas	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	3
	Chimpanzé-comum	<i>Pan troglodytes</i>	10
	Orangotango-de-Samatra	<i>Pongo abelii</i>	4
Total		34	128

* De acordo com Pecon-Slattey, 2014. [#] Animais em coabitação, isto é, saguim-de-tufos-negros (*Callithrix penicillata*) e mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*).

2.2. Colheita e processamento de amostras biológicas

As amostras fecais foram colhidas das instalações dos animais para recipientes estéreis adequados e devidamente identificados com a espécie de primata e data de colheita. No mesmo dia, foram transportadas para o Instituto de Higiene e Medicina Tropical com refrigeração.

Quando rececionadas no laboratório, as fezes foram processadas de imediato em câmara de segurança biológica classe II (BSB 4A, Gelare Flow Laboratories, Austrália). Uma pequena porção de amostra foi transferida para tubo Falcon de 15 ml contendo 5 ml de tampão de fosfatos salino (PBS) para uma concentração de aproximadamente 10% (p/v). A suspensão foi vigorosamente homogeneizada com o auxílio de esferas de vidro e vórtex, seguindo-se a clarificação por centrifugação a 2 500 x g, 15 minutos (Centrifuge 5810R, Eppendorf AG, Alemanha). O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de 0,2 µm com pré-filtro (Sterile Acrodisc® Syringe Filters, Pall Corporation, Estados Unidos da América [E.U.A.]). A amostra restante não processada foi armazenada a -80°C e a suspensão filtrada foi imediatamente inoculada em culturas celulares ou guardada a -20°C para posterior análise molecular, de acordo com o esquema apresentado na Figura 2.2.

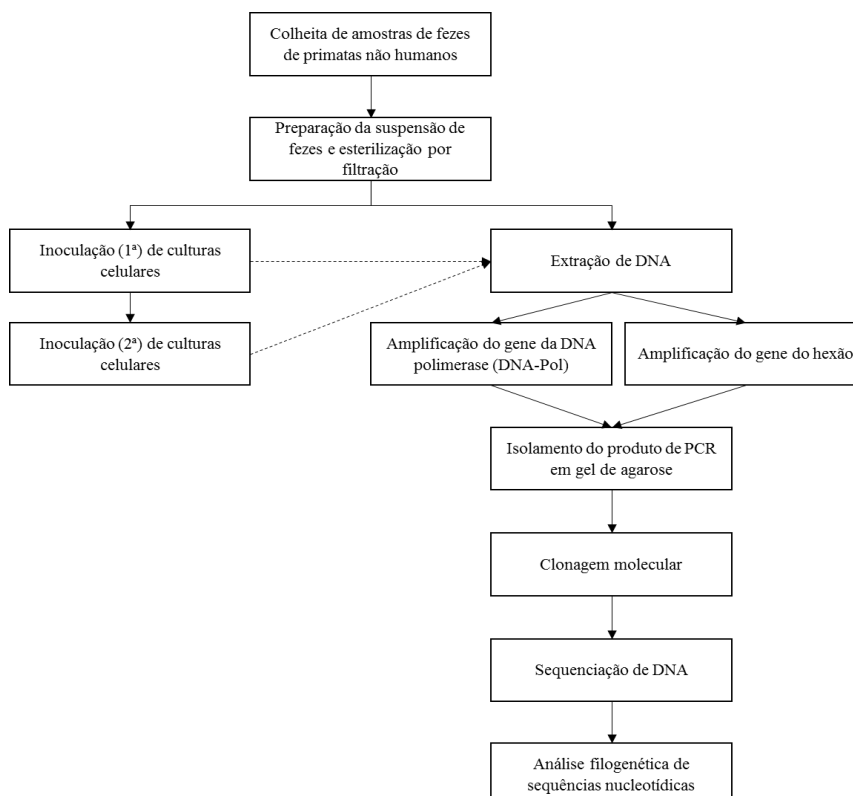


Figura 2.2 Fluxograma dos procedimentos laboratoriais seguidos para isolamento, detecção e caracterização de adenovírus a partir de amostras fecais de primatas.

2.3. Inoculação de culturas celulares

A suspensão de fezes filtrada foi inoculada em culturas aderentes de linhas celulares contínuas. No caso de amostras originárias de grandes símios utilizou-se a linha celular humana A549 derivada de carcinoma do pulmão (Vircell, Espanha). Para as restantes amostras utilizou-se a linha Vero E6 de epitélio renal de macaco-verde-africano que apresenta algum grau de inibição de contato, sendo especialmente útil para o isolamento de vírus com replicação lenta. As células cresceram em frascos de plástico ventilados (Corning, E.U.A.), com meio de cultura MEM (do inglês, *Minimum Essential Medium*) de Earle com glutamina estável (Biochrom AG, Alemanha) suplementado com penicilina (100 U/ml), estreptomicina (10 µg/ml) e 10% de soro fetal bovino (FBS) (Lonza, Bélgica), numa estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂) (Heracell™ 150, Heraeus, Alemanha). Quando a monocamada celular atingia cerca de 90% de confluência, procedia-se à subcultura para novos frascos, em câmara de fluxo laminar (Faster BHA 48), através da dissociação das células por tripsinização. Genericamente, decantou-se o meio metabolizado e procedeu-se a duas lavagens com PBS (Lonza, Bélgica). De seguida, adicionou-se a solução de tripsina-EDTA (Lonza, Bélgica), descartou-se o excedente e incubou-se a 37°C durante 2-3 minutos, acompanhando visualmente o descolamento das células. As células foram ressuspensas em meio de cultura completo e transferidas para novos frascos com meio fresco, numa proporção de 1:8, e colocadas a 37°C, 5% CO₂.

Para o isolamento de vírus utilizaram-se culturas celulares subconfluentes crescidas em frascos de 25 cm² (T25). O meio de cultura foi removido por decantação e as células inoculadas com cerca de 300 µl de suspensão filtrada (1ª inoculação). Seguiu-se 1 hora de adsorção a 37°C, 5% CO₂, durante a qual os frascos foram suavemente agitados com regularidade para potenciar o contato de eventuais vírus com as células. Após este período, adicionou-se 5 ml de novo meio de cultura com a concentração de FBS reduzida para 2%.

Para cada amostra foi ainda realizada uma passagem cega (2ª inoculação). Resumidamente, as células da 1ª inoculação foram dissociadas por ação mecânica, com auxílio de um raspador (Orange Scientific, Bélgica), transferidas para um tubo Falcon de 15 ml e centrifugadas a 2 500 x g, 4°C, 5 minutos. Após remoção do sobrenadante, o sedimento celular foi ressuspensado em 2 ml de meio com 2% de FBS, congelado em

azoto líquido e descongelado em banho-maria a 37°C, sendo este processo repetido mais duas vezes. Executou-se uma nova centrifugação nas condições anteriores para retirar os detritos celulares e inoculou-se 300 µl do sobrenadante em novas culturas celulares, procedendo-se como descrito para a 1ª inoculação.

A presença de efeito citopático (CPE) foi monitorizada por observação regular das células ao microscópio invertido (Olympus CKX41, Olympus Corporation, Japão). Durante todos os processos foram mantidas e observadas, em paralelo, culturas não infectadas (controles negativos).

2.4. Extração de DNA

A partir da suspensão filtrada de fezes, procedeu-se à extração de DNA viral através do sistema comercial *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante para o protocolo de isolamento de ácidos nucleicos a partir de sangue total de mamífero, *buffy-coat* ou cultura de células. Assim, iniciou-se o procedimento distribuindo 200 µl de tampão de ligação por tubos devidamente identificados, aos quais se adicionou 200 µl da respetiva amostra fecal e 40 µl de proteinase K (fornecida com o *kit*). Seguiu-se homogeneização vigorosa com vórtex e incubação a 70°C, 10 minutos. Adicionou-se então 100 µl de isopropanol, agitou-se bem com vórtex e transferiu-se a mistura de reação para a coluna de purificação, previamente inserida no respetivo tubo coletor. As amostras foram centrifugadas a 8 000 x g, 1 minuto (Centrifuge 5415D, Eppendorf AG, Alemanha) e o tubo coletor esvaziado. Seguiu-se a lavagem do DNA retido na coluna através da adição de 500 µl de tampão de remoção de inibidores seguida de nova centrifugação a 8 000 x g, 1 minuto. Após esvaziamento do tubo coletor, adicionou-se à coluna 500 µl de tampão de lavagem seguida de centrifugação nas mesmas condições, sendo este passo repetido e os tubos submetidos a uma centrifugação curta a 13 000 x g para remoção do tampão de lavagem residual. O DNA foi eluído pela adição de 200 µl de tampão de eluição, pré-aquecido a 70°C, e centrifugação. O DNA foi guardado a -20°C ou usado de imediato para análise por métodos moleculares.

2.5. Detecção de adenovírus por PCR

Para a detecção de adenovírus (AdVs) nas amostras em estudo, realizaram-se reações de amplificação de DNA viral por *nested*-PCR (reação em cadeia da polimerase) tendo como alvo duas regiões codificadoras distintas, designadamente regiões altamente conservadas do gene da DNA polimerase (DNA-Pol) e do gene do hexão de mastadenovírus de primatas. Utilizaram-se *primers* universais degenerados e substituídos com desoxinosina desenhados por Wevers e colaboradores (2010). Na Tabela 2.2 estão descritas a sequência e a localização no genoma dos diferentes *primers* usados. Os *primers*, sintetizados pela empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal), foram preparados como solução *stock* de 200 pmol/μl e, subsequentemente, diluídos para soluções de trabalho de 20 pmol/μl que se guardaram a -20°C.

Tabela 2.2 *Primers* utilizados para a amplificação de segmentos dos genes da DNA polimerase (DNA-Pol) e do hexão.

Gene-alvo	Localização (nucleótidos)*	Primer	Sequência 5' - 3'§	Amplificação (pares de bases)
DNA-Pol	6722-6747	4431-S [#]	GTnTwyGAyAThTGyGGhATGTAYGC	1002
	5745-5765	4428-AS	GAGGCTGTCCGTrTC(n/i)CCGTA [‡]	
	6487-6507	4428-S	CGGACGCCCTCTGyTGGAC(n/i)AA	650
	5857-5874	4429-AS	GGCCAGCACrAA(n/i)GArGC	
hexão	21086-21104	4515-S	GTGGATGG(n/i)GA(r/i)GG(n/i)TACA	536
	21601-21620	4515-AS	CGCACAACGTC(r/i)AA(n/i)AC(y/i)TC	
	21116-21136	4516-S	TGTAACATGAC(y/i)AA(r/i)GA(y/i)TGG	381
	21480-21496	4516-AS	CAGGGCCCCCAT(n/i)GACA	

* Com base na sequência referência de adenovírus humano tipo 5 (HAdV-5) (número de acesso: AC_000008.1); [#] S = direto (*sense*), AS = reverso (*antisense*); [§] De acordo com códigos de ambiguidade da IUPAC para nucleótidos (Anexo 1); [‡] i = inosina.

2.5.1. Amplificação de segmentos dos genes da DNA polimerase e do hexão

A primeira reação de amplificação por *nested*-PCR de um segmento do gene da DNA-Pol foi realizada num volume total de 25 μl com 12,5 μl de *NZYTaq 2x Green Master Mix* (NZYTech, Portugal), 20 pmol de cada um dos *primers* 4431-S e 4428-AS, 5 μl de DNA matriz e água sem nucleases (5,5 μl) para perfazer o volume final. Na segunda reação usou-se uma mistura de reação idêntica com os *primers* 4428-S e 4429-AS e 2 μl do produto da primeira reação como DNA matriz. As reações de amplificação foram efetuadas no termociclador *iCycler*[®] (Bio-Rad Laboratories, E.U.A.). Na Tabela 2.3 estão descritas as condições de termociclagem, comuns às duas reações.

Tabela 2.3 Condições de amplificação de segmentos dos genes da DNA polimerase (DNA-Pol) e do hexão.

Etapa (nº de ciclos)		Condições de amplificação
Desnaturação inicial (1x)		95°C, 5 minutos
Amplificação (45x)	Desnaturação	95°C, 30 segundos
	Hibridação de <i>primers</i>	45°C, 30 segundos
	Polimerização	72°C, 2 minutos*
Extensão final (1x)		72°C, 15 minutos

* 1 minuto para o segmento do gene do hexão.

A detecção da presença de genoma de AdVs através da amplificação de uma sequência da região codificadora do hexão foi realizada de forma semelhante ao descrito para a DNA-Pol, usando os pares de *primers* 4515-S/4515-AS e 4516-S/4516-AS na primeira e segunda reação, respetivamente (Tabela 2.2). A mistura de reação e condições de termociclagem foram idênticas (Tabela 2.3), com exceção do tempo de polimerização que foi reduzido para 1 minuto no caso do gene do hexão.

2.6. Análise dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose

Os fragmentos de DNA amplificados por *nested*-PCR foram observados após separação por eletroforese em gel de 1,2% de agarose, em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) (Anexo 2) 0,5X e 0,5 µg/ml de brometo de etídio. Aplicaram-se 4 µl do produto de PCR e 3,5 µl de marcador de tamanho molecular *GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, E.U.A.) para estimativa do tamanho dos fragmentos de DNA amplificados. Usou-se o sistema *Sub-Cell® GT* (Bio-Rad Laboratories, E.U.A.) ou, em alternativa, o sistema *Hoefer™ HE 33 Mini Submarine* (GE Healthcare, Reino Unido), com corrente elétrica constante de 80 Volts, durante cerca de 2 horas. Os fragmentos de DNA foram visualizados após exposição do gel a radiação ultravioleta (UV) no equipamento *Gel Doc™ XR+* (Bio-Rad Laboratories, E.U.A.), que também permitiu a captura de imagem.

2.7. Purificação de produtos de PCR

Após separação eletroforética dos produtos de amplificação, identificaram-se as bandas com o tamanho esperado, presuntivas da presença de AdVs. Para as reações positivas selecionadas, o restante produto de PCR (21 µl) foi separado num gel preparado como descrito anteriormente (2.6.), mas prolongando o tempo de migração eletroforética

(~3 horas) para uma melhor separação da banda de interesse. Com o auxílio de um bisturi e sob radiação UV, a banda foi excisada do gel para se proceder à purificação do DNA.

A purificação foi executada com o sistema comercial *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research, E.U.A.), segundo as especificações do fabricante. Genericamente, após pesagem da fatia de gel de agarose removida, adicionou-se *Agarose Dissolving Buffer* (ADB) numa proporção de 1:3 de gel:ADB e o tubo foi incubado a 55°C, 5-10 minutos, até dissolução da agarose. Transferiu-se então a mistura para uma coluna de purificação, previamente acoplada a um tubo coletor, e procedeu-se a uma centrifugação de 30 segundos a 16 000 x g. Seguiram-se duas lavagens com 200 µl de tampão de lavagem e centrifugação nas condições supracitadas. O DNA retido na coluna foi eluído com 10 µl de água sem nucleases e centrifugação. Para confirmação da purificação do produto de PCR pretendido e estimativa da quantidade relativa de DNA purificado analisou-se por eletroforese 1 µl de produto final.

2.8. Clonagem molecular

Considerando que se trata de amostras fecais e se utilizaram *primers* degenerados e temperaturas de hibridação relativamente baixas nas duas reações de amplificação, era expectável a existência de amplificações inespecíficas, inclusivamente com produtos do mesmo tamanho da sequência alvo. Assim, tornou-se necessário recorrer a clonagem molecular para se obter cromatogramas com boa qualidade quando da sequenciação. Optou-se pela utilização do sistema comercial *pGEM®-T Easy Vector System I* (Promega, E.U.A.), o qual consiste num vetor linearizado com uma timidina (T) no extremo 3' de ambas as cadeias. Estas timidinas no local de inserção do fragmento a clonar aumentam a eficiência da ligação por dificultarem a recircularização do vetor e por fornecerem uma extremidade complementar dos produtos de PCR obtidos com Taq polimerase que adicione adenosinas (A) às extremidades 3' dos produtos de PCR. O vetor possui promotores de transcrição T7 e SP6 que flanqueiam a região de clonagem múltipla dentro da região codificadora do α -péptido da enzima β -galactosidase (*lacZ*). A inativação do α -péptido, por inserção de fragmentos de DNA, permite a identificação de clones recombinantes por rastreio de colónias brancas/azuis, devendo os clones bacterianos com moléculas recombinantes apresentar cor branca quando semeados em placas de agar contendo 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-tiogalactopiranósido (X-Gal) e isopropil- β -D-

tiogalactopiranosido (IPTG). A região de clonagem múltipla do vetor é ainda flanqueada por locais de reconhecimento de enzimas de restrição, entre as quais a *EcoRI*, que possibilita numa única digestão enzimática a libertação do fragmento de DNA inserido. O plasmídeo tem um tamanho de 3015 pares de bases (pb). O mapa físico e características do vetor encontram-se apresentados na Figura 2.3. Mais uma vez, foram seguidas as especificações do fabricante durante o processo.

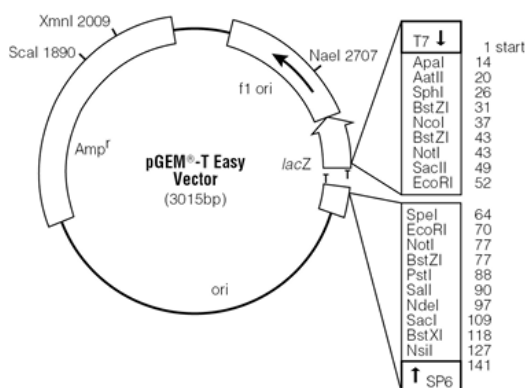


Figura 2.3 Mapa do vetor *pGEM®-T Easy*. Adaptado de www.promega.com

2.8.1. Ligação do fragmento de DNA ao vetor *pGEM®-T Easy*

A ligação do fragmento de DNA ao plasmídeo foi realizada através da preparação de uma mistura de reação constituída por 3,5 µl de produto de PCR purificado a partir do gel de agarose, 5 µl de solução tampão 2X, 0,5 µl de vetor *pGEM®-T Easy* (50 ng/µl) e 1 µl de T4 DNA ligase (3 U/µl), perfazendo um volume total de 10 µl. De modo a aumentar a eficiência da reação, os tubos foram incubados a 4°C durante a noite.

2.8.2. Preparação de células *Escherichia coli* JM109 competentes

Para a obtenção de clones recombinantes, a mistura de ligação foi usada para transformar a estirpe JM109 de *Escherichia coli*. Para tal, em condições de assepsia, procedeu-se à inoculação de células JM109, que se encontravam armazenadas a -80°C, em 3 ml de meio de cultura líquido Luria-Bertani (LB) (Anexo 2) e incubou-se a 37°C com agitação (220 rotações por minuto [rpm]) (Infors AG, Suíça) durante a noite. Transferiu-se 200 µl da cultura saturada para 20 ml de meio LB (diluição de 1:1000) e incubou-se a 37°C com agitação (220 rpm), fazendo a monitorização do crescimento da cultura através de leitura da densidade ótica (D.O.) a 600 nm (Spectronic™ 20D+, Thermo

Scientific, E.U.A.) até atingir um valor entre 0,4 e 0,5. As células bacterianas foram então transferidas para um tubo Falcon de 50 ml arrefecido em gelo e sedimentadas por centrifugação a 3 000 x g, 4°C, 15 minutos (Centrifuge 5810R, Eppendorf AG, Alemanha). Após rejeição do sobrenadante, o sedimento celular foi ressuspensionado em 1 ml de solução de transformação e armazenamento (TSS) (Anexo 2) fria, tendo as células bacterianas alcançado o estado de competência e, portanto, susceptíveis de internalizar DNA.

2.8.3. Transformação por choque térmico

O processo de transformação ocorreu pelo método de choque térmico. A tubos Eppendorf de 1,5 ml, arrefecidos em gelo e contendo 100 µl da suspensão de células competentes, foram adicionados 5 µl da mistura de ligação com homogeneização suave. Os tubos foram mantidos em gelo durante 30 minutos. Terminado este período, foram imediatamente colocados num banho-maria a 42°C durante 90 segundos e novamente transferidos para gelo, onde permaneceram mais 5 minutos. De forma a proporcionar um período de recuperação e expressão do gene de resistência, foram adicionados 900 µl de meio líquido LB às suspensões bacterianas que se incubaram a 37°C, com agitação suave (~70 rpm), 1 hora. As suspensões bacterianas foram então semeadas, com o auxílio de um espalhador e em condições de assepsia, em placas de Petri com cerca de 20 ml de meio LB sólido seletivas, contendo ampicilina (100 µg/ml), X-Gal (40 µg/ml) e IPTG (0,2 mM). Cada suspensão foi semeada em triplicado, sendo que duas placas foram inoculadas com 100 µl cada e a terceira com o sedimento celular resultante de uma centrifugação a 16 000 x g, 1 minuto. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite.

2.8.4. Extração de DNA plasmídico pelo método de lise alcalina

A partir das culturas em meio LB sólido seletivo, selecionaram-se 5 clones de cor branca de cada amostra para extração de DNA plasmídico pelo método de lise alcalina. Para tal, procedeu-se à picagem de colónias bacterianas individuais, com um palito estéril, para 2,5 ml de meio LB líquido suplementado com 100 µl/ml de ampicilina e incubação a 37°C, com agitação (220 rpm), durante a noite. No dia seguinte, transferiram-se 2 ml da cultura bacteriana saturada para tubos devidamente identificados e procedeu-se à sua sedimentação por centrifugação a 13 000 x g, 1 minuto. Após rejeição do sobrenadante,

as células foram ressuspensas, com o auxílio de vórtex, em 300 µl de solução TEG (Anexo 2), adicionou-se 300 µl de solução de lise (Anexo 2), promovendo a lise bacteriana por inversão suave dos tubos, e 300 µl de solução de acetato de potássio (3 M, pH 5,2) para neutralizar o pH do lisado celular. Após centrifugação a 13 000 x g, 15 minutos, o sobrenadante foi transferido para novos tubos para precipitação do ácido nucleico através da adição de 700 µl de isopropanol, sendo a mistura homogeneizada por inversão e submetida a nova centrifugação a 13 000 x g, 30 minutos. O sedimento resultante foi lavado com 300 µl de etanol a 70%, seguido de centrifugação a 13 000 x g, 5 minutos e rejeição do sobrenadante. Subsequentemente, os sedimentos foram secos sob vácuo (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Alemanha). Para finalizar, o sedimento foi ressuspensado em 30 µl de TE (Anexo 2) suplementado com 50 µg/ml de RNaseA e incubado 30 minutos a 37°C para digerir o RNA.

2.8.5. Digestão enzimática

A seleção de plasmídeos recombinantes com o fragmento de DNA de tamanho pretendido foi realizada por digestão enzimática com a endonuclease de restrição EcoRI. DNA plasmídico obtido no passo anterior (2 µl) foi digerido com 10 U de EcoRI (Fermentas, Portugal) em tampão fornecido com a enzima, num volume total de 20 µl. A digestão decorreu durante a noite a 37°C. Os produtos da digestão enzimática foram separados por eletroforese em gel de agarose, paralelamente com marcadores de tamanho molecular, visualizados por exposição a radiação UV e analisados quanto à presença do inserto esperado.

2.8.6. Purificação de DNA plasmídico

O DNA dos plasmídeos recombinantes selecionados foi purificado com o sistema comercial *DNA Clean & Concentrator*TM-5 (Zymo Research, E.U.A.), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, perfez-se o volume de DNA plasmídico para 100 µl com água bidestilada e adicionou-se 200 µl de tampão de ligação de DNA. Após agitação no vórtex, transferiu-se a mistura para uma coluna de purificação, previamente acoplada a um tubo coletor, e procedeu-se a uma centrifugação de 30 segundos a 16 000 x g. Adicionou-se 200 µl de tampão de lavagem à coluna, seguindo-se nova centrifugação e repetição deste passo de lavagem. Para a eluição do DNA retido na coluna, adicionou-

se 16 µl de tampão de eluição de DNA, seguido de centrifugação. A concentração de ácidos nucleicos no eluato foi estimada por medição da D.O._{260nm} no equipamento NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, E.U.A.).

2.9. Sequenciação de DNA

As amostras selecionadas para obtenção da sequência nucleotídica foram enviadas para a empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal). Para tal, foram preparados microtubos, devidamente identificados, com 15 µl de solução contendo DNA plasmídico purificado. A sequenciação de DNA foi executada pelo método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), sendo utilizado o *primer* universal direto T7, complementar de uma das sequências que flanqueia o local de clonagem do vetor utilizado.

2.10. Análise bioinformática de sequências nucleotídicas

As sequências nucleotídicas obtidas após sequenciação foram avaliadas de modo rápido e grosso (após remoção de sequências do plasmídeo e *primers*) através de pesquisa no programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990), recurso disponibilizado pelo *National Center for Biotechnology Information*. Visto que o programa compara a similaridade entre a sequência pretendida e as depositadas na base de dados, e calcula ainda a significância estatística de cada resultado (*e-value*), esta etapa possibilitou a confirmação da identidade de sequências parciais de AdVs, permitindo a exclusão de sequências não desejadas.

2.10.1. Análise de cromatogramas e edição de sequências

Os cromatogramas das sequências nucleotídicas de interesse foram analisados cuidadosamente e as respectivas sequências editadas no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.2.5 (Hall, 1999). A análise dos cromatogramas baseou-se na verificação de existência de regiões com nucleótidos não definidos ou picos sobrepostos. A edição manual consistiu na correção de eventuais discrepâncias entre o cromatograma e a sequência nucleotídica e identificação e eliminação de sequências referentes ao plasmídeo e aos *primers* utilizados.

2.10.2. Pesquisa de homologia genética

Após a edição, as sequências genômicas obtidas foram novamente submetidas a pesquisa no programa BLAST, desta vez para identificação de sequências conhecidas de AdVs com maior similaridade.

2.10.3. Análise filogenética

A fim de se proceder à análise de relações filogenéticas através da construção de árvores, foi necessário obter sequências públicas passíveis de comparação com as duas regiões codificadoras em estudo. Para tal, para cada região, foram retiradas da base de dados *GenBank* sequências de referência de AdVs representativas de todas as espécies referentes a hospedeiros primatas; sequências de AdVs mais similares resultantes da pesquisa efetuada em BLAST; e, ainda, sequências de AdVs em fase de candidatura a classificação oficial, ou até mesmo não classificadas, cuja identificação está descrita na literatura. Foram também obtidas sequências pertencentes a outros gêneros como sequências *outgroup*. Os números de acesso das sequências de referência de AdVs utilizadas na análise encontram-se listados no Anexo 5.

Os alinhamentos múltiplos das sequências nucleotídicas foram realizados com recurso ao programa *Clustal Omega* (Sievers *et al.*, 2011), sendo estes posteriormente analisados e editados em *Bioedit* de modo a remover as porções não correspondentes às sequências nucleotídicas conseguidas para as regiões codificadoras de DNA-Pol e hexão.

As árvores filogenéticas foram construídas no programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versão 6 (Tamura *et al.*, 2013). A sua construção teve por base o método *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), com a aplicação do modelo de 2 parâmetros de Kimura (Kimura, 1980) para o cálculo de matriz de distâncias genéticas. A robustez da inferência filogenética foi avaliada através do método de *bootstrapping* (Felsenstein, 1985) com base em 1000 amostragens aleatórias, sendo considerados estatisticamente significativos valores iguais ou superiores a 70%.

De modo a aumentar a robustez da análise foi efetuada paralelamente a construção de árvores filogenéticas com sequências alinhadas pelo programa *Multiple Alignment using Fast Fourier Transform* (MAFFT) (Katoh & Standley, 2013), que possui um algoritmo de alinhamento distinto.

2.10.4. Análise de sequências divergentes

Algumas sequências divergentes foram analisadas relativamente à existência de fenómenos de recombinação. Assim, a pesquisa de genomas recombinantes foi realizada com recurso ao programa *SimPlot* versão 3.5.1 (Lole *et al.*, 1999). Resumidamente, este permite a construção de gráficos de similaridade entre sequências de referência e do estudo alinhadas, com base em segmentos parcelares (janela) que se deslocam num incremento definido (passos) ao longo das mesmas. No mesmo programa, através de análise pelo método de *bootscanning*, o conceito anterior é associado à construção de árvores filogenéticas com cálculo de valores de *bootstrap* para os diferentes agrupamentos originados. À semelhança da construção de árvores filogenéticas em MEGA 6, foram aplicados o modelo de *Neighbor-Joining* para a construção e o modelo Kimura a 2 parâmetros para o cálculo de distâncias genéticas. Ainda, de igual modo, o método de *bootstrapping* teve por base 1000 replicados, sendo considerados estatisticamente significativos valores iguais ou superiores a 70%.

3. Resultados

3. Resultados

3.1. Detecção de adenovírus por PCR

A detecção de DNA de adenovírus (AdVs) foi realizada através da amplificação por *nested*-PCR de sequências de dois genes virais em preparações de DNA extraído de suspensões de amostras fecais. Os *primers* utilizados nas reações de amplificação tiveram como alvo sequências parciais dos genes virais da DNA polimerase (DNA-Pol) e do hexão com aproximadamente 650 e 380 pares de bases (pb), respetivamente. Seguindo-se o protocolo de amplificação descrito em Wevers *et al.* 2010 e Wevers *et al.* 2011, desenhado com uma finalidade semelhante, definiu-se como critério para a detecção presuntiva de AdVs a presença de um ou de ambos os amplicões.

Numa fase inicial, o protocolo de amplificação de sequências codificadoras da DNA-Pol foi testado com cinco amostras fecais humanas, provenientes de crianças com gastroenterite, positivas para HAdV-40 e HAdV-41, tendo-se obtido amplicões com o tamanho esperado para todas. Quando da aplicação deste protocolo a DNA extraído das amostras fecais símiás, foram obtidos perfis complexos de migração dos produtos de PCR, com uma pluralidade de bandas resultantes de amplificação inespecífica (Figura 3.1A). Este resultado, não sendo inesperado devido aos *primers* usados serem muito degenerados, dificultava a análise das amostras. Tentou-se eliminar a inespecificidade do PCR aumentando de 45°C para 55°C a temperatura de emparelhamento dos *primers*. Nestas condições foram testadas quatro amostras com diferentes padrões de amplificação a 45°C (amostras 1, 5, 6 e 9) não se tendo obtido qualquer produto de amplificação específico, mas apenas um arrastamento (Figura 3.1A).

Ainda, no sentido de reduzir a inespecificidade, procedeu-se à eliminação de contaminantes da suspensão de fezes passando a usar-se DNA extraído das suspensões filtradas usadas na inoculação de culturas celulares. Esta alteração ao protocolo permitiu eliminar algum fundo e um enriquecimento no produto pretendido correspondendo à banda de 650 pb (Figura 3.1B). Com o objetivo de aumentar a proporção relativa de DNA viral, as suspensões de fezes filtradas foram também tratadas com a nuclease Benzonase® (0,1 U/μl, 2 horas) antes da extração de DNA, um tratamento frequentemente combinado com a filtração nos protocolos de metagenómica para detecção de genomas virais em amostras complexas (Hall *et al.*, 2014). Como é possível observar na Figura 3.2, o tratamento adicional com Benzonase® de duas amostras (amostras 35 e 40), com padrões

diferentes de amplificação e intensidades diferentes da banda de ~650 pb, não reduziu o número de bandas resultantes do PCR comparativamente com o obtido apenas com filtração, pelo que se manteve apenas a filtração no processamento das amostras.

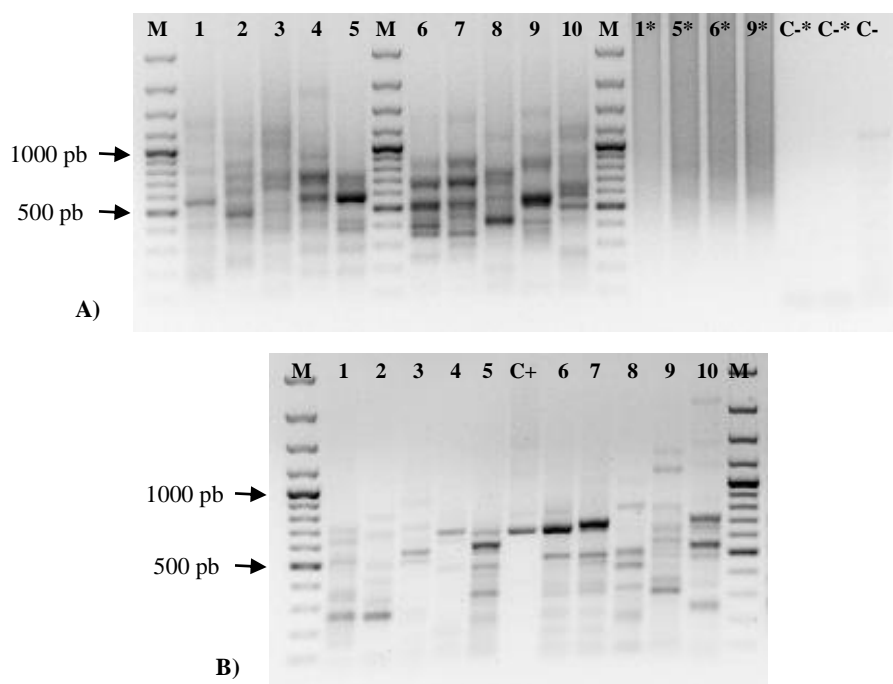


Figura 3.1 Amplificação por *nested*-PCR da região codificadora da DNA polimerase (~650 pb) (i) antes (A) e depois (B) do processamento das suspensões fecais por filtração e (ii) com alteração da temperatura de hibridação de *primers* para 55°C (A,*), em gel de agarose a 1,2%, com brometo de etídeo. (M=marcador de tamanho molecular; C+=controle positivo HAdV-40; pb=pares de bases)

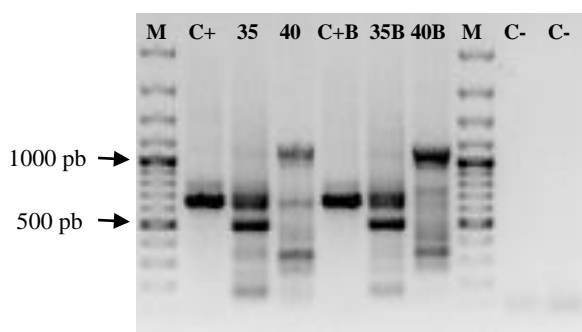


Figura 3.2 Efeito do pré-tratamento de suspensões fecais com Benzonase® na amplificação por *nested*-PCR da região codificadora da DNA polimerase (~650 pb) após filtração (C+, 35, 40) e após filtração associada a tratamento com Benzonase® (C+B, 35B, 40B), em gel de agarose a 1,2%, com brometo de etídeo. (M=marcador de tamanho molecular; C+=controle positivo HAdV-40; C-=controle negativo; pb=pares de bases)

Relativamente à amplificação da região codificadora do hexão, e comparativamente com a da DNA-Pol, o padrão eletroforético dos produtos de PCR revelou-se mais simples, tornando-se mais evidente o produto esperado de ~380 pb contra um fundo com menor número de bandas em grande parte das amostras. A Figura 3.3 apresenta, a título de exemplo, resultados obtidos para 17 amostras (amostras 112 a 128) para ambas as regiões codificadoras pesquisadas. Como é possível verificar para a DNA-Pol (Figura 3.3A), apesar de por vezes ser bastante clara a presença de fragmentos de DNA de tamanho esperado (como, por exemplo, amostras 112, 119 ou 123), outras vezes a banda é tão ténue e/ou tão próxima de outras que dificulta a interpretação do perfil encontrado (como no caso das amostras 116, 125 ou 128).

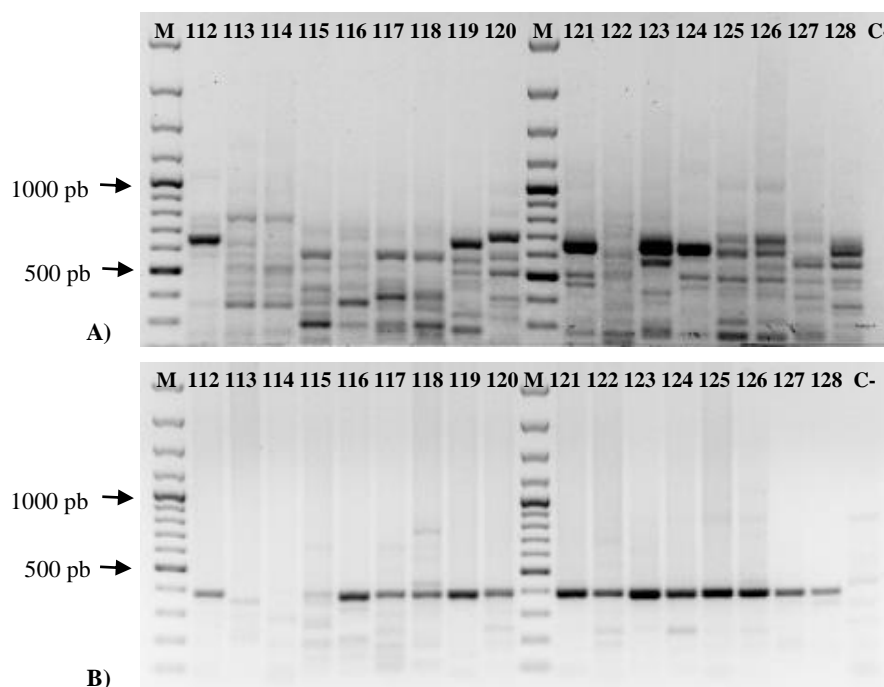


Figura 3.3 Amplificação por *nested*-PCR das regiões codificadoras da DNA polimerase (~650 pb) (A) e do hexão (~380 pb) (B), em gel de agarose a 1,2%, com brometo de etídeo. (M=marcador de tamanho molecular; C=controlo negativo; pb=pares de bases)

A análise dos produtos de PCR para os dois genes alvo nas 128 amostras fecais estudadas revelou que 42 amostras geraram apenas uma banda compatível com a amplificação da sequência codificadora da DNA-Pol, 26 apresentaram apenas uma banda correspondente à sequência esperada para o gene do hexão e 38 deram origem à amplificação de sequências nucleotídicas dos dois genes de AdVs (Anexo 3). No total, a taxa de deteção de AdVs foi de 82,8%. A Tabela 3.1 expõe os resultados encontrados no

que respeita à detecção de AdVs em função do grupo e espécie de primata. É de salientar que a detecção presuntiva de AdVs ocorreu em todas as espécies de hospedeiro incluídas no estudo. A taxa de detecção mais baixa foi entre os macacos do Novo Mundo (MNM) (67,5%), seguida de macacos do Velho Mundo (MVM) (85,4%) e grandes símios (88,2%). Para os lêmures e gibões todas as amostras foram positivas para AdVs.

Tabela 3.1 Taxas de detecção de adenovírus por PCR em amostras fecais de primatas de acordo com a espécie hospedeira de origem.

Primata		Detecção de adenovírus por PCR	
Nome Comum	Nome científico*		
Lêmures	Lémure-de-fronte-branca	<i>Eulemur albifrons</i>	2/2 (100%)
	Lémure-preto	<i>Eulemur macaco macaco</i>	4/4 (100%)
	Lémure-de-cauda-anelada	<i>Lemur catta</i>	5/5 (100%)
	Lémure-vermelho	<i>Varecia variegata rubra</i>	1/1 (100%)
	Lémure-preto-e-branco-de-colar	<i>Varecia variegata variegata</i>	5/5 (100%)
Macacos do Novo Mundo	Macaco-uvador-preto	<i>Alouatta caraya</i>	1/2 (50%)
	Macaco-aranha-da-Colômbia	<i>Ateles fusciceps rufiventris</i>	3/5 (60%)
	Macaco-de-Goeldi	<i>Callimico goeldii</i>	1/4 (25%)
	Saguim-de-face-branca	<i>Callithrix geoffroyi</i>	1/1 (100%)
	Saguim-comum	<i>Callithrix jacchus</i>	1/2 (50%)
	Mico-leão-de-juba-dourada	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	1/1 (100%)
	Mico-leão-dourado	<i>Leontopithecus rosalia</i>	3/3 (100%)
	Saguim-bicolor	<i>Saguinus bicolor</i>	1/2 (50%)
	Saguim-imperador	<i>Saguinus imperator subgriseus</i>	2/2 (100%)
	Saguim-de-mãos-douradas	<i>Saguinus midas</i>	2/2 (100%)
	Saguim-cabeça-de-algodão	<i>Saguinus oedipus</i>	1/2 (50%)
	Saimiri-da-Bolívia	<i>Saimiri boliviensis</i>	1/5 (20%)
	Macaco-fidalguinho	<i>Sapajus apella</i>	3/3 (100%)
	Macaco-capuchinho-de-peito-amarelo	<i>Sapajus xanthosternos</i>	5/5 (100%)
	Indeterminada [#]	<i>Indeterminada</i>	1/1 (100%)
Macacos do Velho Mundo	Macaco-de-nariz-branco	<i>Cercopithecus ascanius</i>	4/4 (100%)
	Macaco-de-beiço-branco	<i>Cercopithecus cephus</i>	1/1 (100%)
	Macaco-Diana	<i>Cercopithecus diana</i>	2/2 (100%)
	Macaco-de-Brazza	<i>Cercopithecus neglectus</i>	3/5 (60%)
	Macaco-testiverde	<i>Chlorocebus cynosuros</i>	1/1 (100%)
	Colobo-guereza-kikuyu	<i>Colobus guereza kikuyuensis</i>	5/5 (100%)
	Macaco-do-Japão	<i>Macaca fuscata</i>	10/10 (100%)
	Macaco-cauda-de-leão	<i>Macaca silenus</i>	5/5 (100%)
	Babuíno-hamadrias	<i>Papio hamadryas</i>	5/10 (50%)
	Langur-de-Java	<i>Trachypithecus auratus auratus</i>	5/5 (100%)

Primata		Detecção de adenovírus por PCR	
	Nome Comum	Nome científico*	
Gibões	Gibão-de-mãos-brancas	<i>Hylobates lar</i>	4/4 (100%)
	Siamango	<i>Symphalangus syndactylus</i>	2/2 (100%)
Grandes Símios	Gorila-ocidental-das-terras-baixas	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	1/3 (33,3%)
	Chimpanzé-comum	<i>Pan troglodytes</i>	10/10 (100%)
	Orangotango-de-Samatra	<i>Pongo abelii</i>	4/4 (100%)
Total		106/128 (82,8%)	

* De acordo com Pecon-Slaterry, 2014. # Animais em coabitação, isto é, saguim-de-tufos-negros (*Callithrix penicillata*) e mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*).

3.2. Detecção de adenovírus em culturas celulares

Todas as amostras fecais analisadas foram inoculadas, após diluição e filtração, em culturas de linhas celulares contínuas para rastreio de AdVs por observação de efeito citopático (CPE) característico provocado nas culturas e também para posterior isolamento de vírus. O rastreio a nível citopático revelou-se difícil devido à natureza das amostras, sendo observadas alterações generalizadas e inespecíficas da morfologia celular. Frequentemente, também se observou a formação de sincícios devido à replicação de outros vírus símios, nomeadamente herpesvírus, posteriormente confirmados por microscopia eletrónica, e cuja taxa de deteção neste tipo de amostras é elevada (Seimon *et al.*, 2015). Desta forma, este método de rastreio foi abandonado mas as inoculações de culturas celulares mantiveram-se para, no caso de serem detetados AdVs por métodos moleculares, se proceder ao isolamento viral. Efetivamente, para todas as amostras foi feita uma primeira inoculação e uma passagem cega subsequente. Para algumas amostras que geraram CPE suspeito na passagem cega, procedeu-se à deteção de AdVs no sobrenadante de cultura por PCR. Assim, culturas de células A549 inoculadas com amostras provenientes de gorila-ocidental-das-terras-baixas (amostra 112), orangotango-de-Samatra (amostra 116) e chimpanzé-comum (amostras 119, 121 e 125) suportaram a replicação de AdVs com amplificação de sequências de genoma viral codificadoras da DNA-Pol e do hexão. Também foi detetada a presença de AdVs nos sobrenadantes de células Vero E6 infetadas com amostras provenientes de macaco-do-Japão (amostra 35). Apesar de não ser evidente CPE suspeito no caso de culturas de células Vero E6 e A549 inoculadas com amostras de lémures, nas culturas inoculadas com amostras positivas para AdVs no rastreio por PCR testou-se a presença destes vírus sem sucesso. Posteriormente,

e na sequência da análise filogenética efetuada, algumas destas amostras foram inoculadas na linha celular contínua de suíno PK15, tendo-se detetado replicação viral numa delas, lémure-preto-e-branco-de-colar (amostra 105).

3.3. Clonagem molecular de sequências nucleotídicas de adenovírus em vetor plasmídico

Tendo em conta os perfis de migração obtidos no rastreio de AdVs por PCR, justificava-se a obtenção de sequências nucleotídicas após clonagem molecular em vetor plasmídico dos produtos de amplificação com interesse. Porém, para algumas amostras, não ocorreu amplificação de fragmentos inespecíficos ou a quantidade do fragmento de DNA esperado foi muito superior à quantidade dos restantes fragmentos (especialmente na amplificação de sequência parcial do gene do hexão). Em 19 destes casos (amostras 61, 66, 68, 73, 78 da DNA-Pol; amostras 7, 10, 18, 61, 62, 75, 83, 89, 112, 116, 119, 121, 123 e 125 do hexão) foi tentada a sequenciação direta do produto de PCR. Contudo, as sequências nucleotídicas e respetivos cromatogramas revelaram-se de má qualidade e difícil interpretação e, em alguns casos, obtenção de sequências não correspondentes a AdVs quando da pesquisa no programa BLAST. Deste modo, a utilização de sequências obtidas por sequenciação direta foi descartada e procedeu-se à clonagem prévia dos produtos de PCR.

Como anteriormente descrito, foi feita a deteção presuntiva de AdVs em 106 amostras, com amplificação de sequências nucleotídicas da DNA-Pol e do hexão em 80 e 64 amostras, respetivamente, totalizando 144 sequências distintas de AdVs. Face ao elevado número de amostras positivas, foi necessário selecionar os produtos de PCR a clonar. Assim, definiu-se como critérios de seleção: i) espécie do primata hospedeiro, de forma a abranger a maior diversidade possível; ii) intensidade da banda correspondente ao fragmento de DNA de tamanho esperado no gel de agarose; e iii) presença de produtos de amplificação para os dois genes alvo de AdVs de forma a obter mais informação para uma mesma estirpe viral.

Na clonagem dos produtos de PCR utilizou-se o sistema de clonagem T/A com o plasmídeo *pGEM[®]-T Easy* (Promega, E.U.A.), sendo o fragmento de DNA a clonar previamente sujeito a separação eletroforética em gel de agarose, excisada a banda correspondente (a título de exemplo, Figura 3.4) e purificado o DNA em coluna.

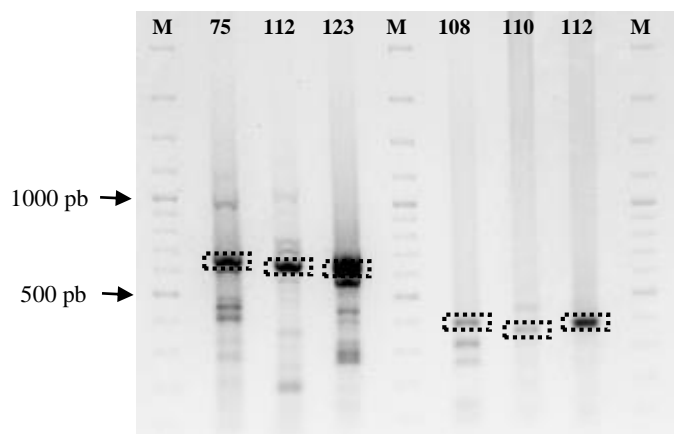


Figura 3.4 Amplificação por *nested*-PCR das regiões codificadoras da DNA polimerase (~650 pb) e do hexão (~380 pb), em gel de agarose a 1,2%, com brometo de etídeo, com identificação (retângulos pontilhados) dos fragmentos de DNA obtidos por excisão do gel para clonagem. (M=marcador de tamanho molecular; pb=pares de bases)

A mistura de ligação foi usada na transformação da estirpe de *E. coli* JM109 e selecionadas cinco colônias bacterianas por fragmento a clonar para subsequente análise da dimensão do fragmento inserido. Para tal, após extração de DNA plasmídico, foi efetuada digestão enzimática do vetor com EcoRI. Como exemplo, a Figura 3.5 apresenta os resultados da digestão enzimática de plasmídeos de transformantes obtidos para sequências presuntivas dos genes da DNA-Pol das amostras 75, 112 e 123 (A) e do hexão das amostras 108, 110 e 112 (B). É visível a presença dos fragmentos correspondentes ao vetor (3015 pb) e ao inserto libertado (~650 ou ~380 pb). Para algumas amostras é evidente a heterogeneidade do tamanho dos fragmentos clonados tanto para a DNA-Pol como para o hexão. Com base nestes resultados, foram selecionados para sequenciação os plasmídeos recombinantes com o inserto mais próximo do tamanho pretendido. Em alguns casos, nomeadamente para a DNA-Pol, foram selecionados vários clones por fragmento a clonar. No total, foram enviados para sequenciação 49 plasmídeos recombinantes contendo insertos de sequências da DNA-Pol correspondentes a 25 amostras fecais e 39 plasmídeos recombinantes com insertos de sequências do hexão correspondendo a 36 amostras (Anexo 4).

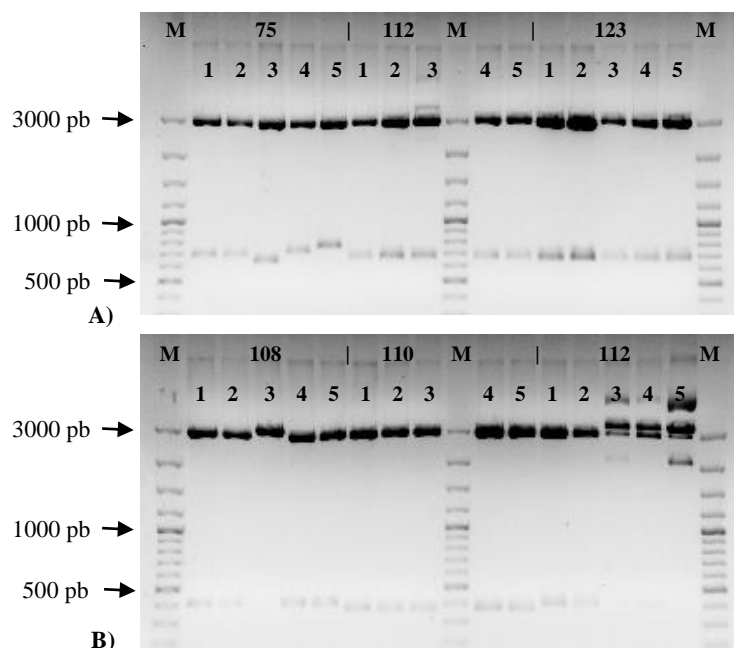


Figura 3.5 Perfis de digestão, com EcoRI, da clonagem de sequências nucleotídicas de DNA polimerase (~650 pb) (A) e hexão (~380 pb) (B), em gel de agarose a 1%, com brometo de etídeo. (M=marcador de tamanho molecular; pb=pares de bases)

3.4. Análise bioinformática de sequências nucleotídicas

Após sequenciação e rápida análise das sequências genômicas obtidas por pesquisa no programa BLAST para confirmação de identidade, foram descartadas as sequências que se revelaram não corresponder a AdVs ou que se encontravam truncadas. No total, obtiveram-se 24 sequências nucleotídicas de AdVs para o gene do hexão (61,5%) e 14 para o gene da DNA-Pol (28,6%), conforme esquematizado de forma gráfica na Figura 3.6. A diferença na percentagem de sequências de AdVs para os dois genes alvo reflete, em parte, a diferença de especificidade da amplificação observada (Figura 3.3).

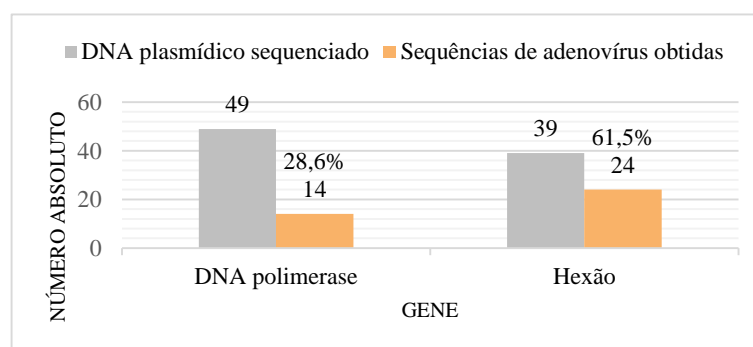


Figura 3.6 Representação gráfica do número de sequências de adenovírus obtidas comparativamente ao número de fragmentos de DNA clonados sequenciados, em função da região codificadora.

Na Tabela 3.2 está descrita a informação referente ao hospedeiro e amostras a partir das quais foram obtidas sequências nucleotídicas de AdVs para caracterização genética.

Tabela 3.2 Sequências nucleotídicas de adenovírus obtidas a partir de amostras fecais de primatas do Jardim Zoológico de Lisboa.

Primata			Sequências nucleotídicas de AdVs obtidas		
	Nome comum	Nome científico*	Amostra	Hexão	DNA-Pol
Lémures	Lémure-de-cauda-anelada	<i>Lemur catta</i>	96	●	
			97	●	
	Lémure-preto	<i>Eulemur macaco macaco</i>	100	●	● ●
			103	●	● ●
	Lémure-preto-e-branco-de-colar	<i>Varecia variegata variegata</i>	104	●	
			105	●	●
			108	●	
Macacos do Novo Mundo	Saguim-imperador	<i>Saguinus imperator subgriseus</i>	18	●	●
			19	●	
Macacos do Velho Mundo	Langur-de-Java	<i>Trachypithecus auratus auratus</i>	7	●	
	Macaco-do-Japão	<i>Macaca fuscata</i>	35	●	●
	Macaco-de-nariz-branco	<i>Cercopithecus ascanius</i>	60	●	
	Colobo-guereza-kikuyu	<i>Colobus guereza kikuyuensis</i>	83	●	
			89	●	● #
Gibões	Gibão-de-mãos-brancas	<i>Hylobates lar</i>	61	●	●
			62	●	
	Siamango	<i>Symphalangus syndactylus</i>	45	●	
			75	●	
Grandes Símios	Gorila-ocidental-das-terras-baixas	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	112	●	●
			116	●	●
	Orangotango-de-Samatra	<i>Pongo abelii</i>	118	●	
			119	●	●
	Chimpanzé-comum	<i>Pan troglodytes</i>	123	●	●
			127	●	
Total				24	13

* De acordo com Pecon-Slaterry, 2014. # Sequências iguais de dois clones distintos.

No decorrer da edição das sequências, tornou-se evidente o facto de as sequências obtidas não serem constituídas pelo número de nucleótidos esperado com os *primers* utilizados. Após subtração dos nucleótidos correspondentes aos *primers*, era prevista a obtenção de sequências compostas por 610 e 343 nucleótidos correspondendo ao gene da DNA-Pol e do hexão, respetivamente. No entanto, para a DNA-Pol as sequências

apresentaram um tamanho variável entre 610 e 619 nucleótidos, nomeadamente 610 (amostras 35, 89 e 123), 613 (amostras 18, 61, 112, 116 e 119), 616 (amostra 103) e 619 (amostras 100 e 105). De igual modo, as sequências do hexão obtidas variaram entre 340 e 349 nucleótidos, designadamente 340 (amostras 83 e 89), 343 (amostras 7, 35, 45, 61, 62, 75, 112, 116, 118, 119, 123 e 127), 346 (amostras 18, 19, 60 e 104) e 349 (amostras 96, 97, 100, 103, 105 e 108).

3.4.1. Relações filogenéticas baseadas em sequências da DNA polimerase

Como indicado anteriormente (2.10.3.), para analisar as relações filogenéticas entre as sequências de AdVs obtidas e as sequências correspondentes de AdVs depositadas nas bases de dados, construíram-se árvores filogenéticas pelo método *Neighbor-Joining*, com base no método de 2 parâmetros de Kimura para o cálculo de matriz de distâncias genéticas. A robustez da inferência genética foi avaliada pelo teste de *bootstrap* (1000 replicados), considerando-se significativos valores $\geq 70\%$. Para aumentar a robustez da análise, foi realizado o alinhamento múltiplo das sequências em dois programas distintos (*Clustal Omega* e MAFFT) e construção das respetivas árvores para comparação de topologias obtidas. No que respeita às sequências de AdVs do estudo não foram observadas diferenças de inferência, tendo-se optado por apresentar e descrever os resultados obtidos nas árvores respeitantes ao alinhamento do programa *Clustal Omega*.

Para apresentação nas árvores filogenéticas, as sequências do estudo foram designadas com AdV (adenovírus), seguido do nome comum do hospedeiro primata, indicação do local onde se encontra cativo (Zoo de Lisboa, ZLX), número atribuído à amostra, hífen (-) ou H em função da sequência nucleotídica corresponder a DNA-Pol ou hexão respetivamente e, finalmente, o número do clone sequenciado. Com o intuito de uniformizar a nomenclatura empregue, passarão a ser designados desta forma também ao longo do texto. Ainda, utilizou-se indiscriminadamente esta designação quer para referência à sequência quer para o AdV de onde a sequência provém.

Às 13 sequências nucleotídicas do estudo relativas ao gene da DNA-Pol de AdVs foram adicionadas 145 sequências correspondentes, retiradas das bases de dados, utilizadas como referência (Anexo 5). No total, foram tidas em consideração 158 sequências parciais do gene da DNA-Pol (557 posições nucleotídicas) para a construção da árvore filogenética apresentada na Figura 3.7A.

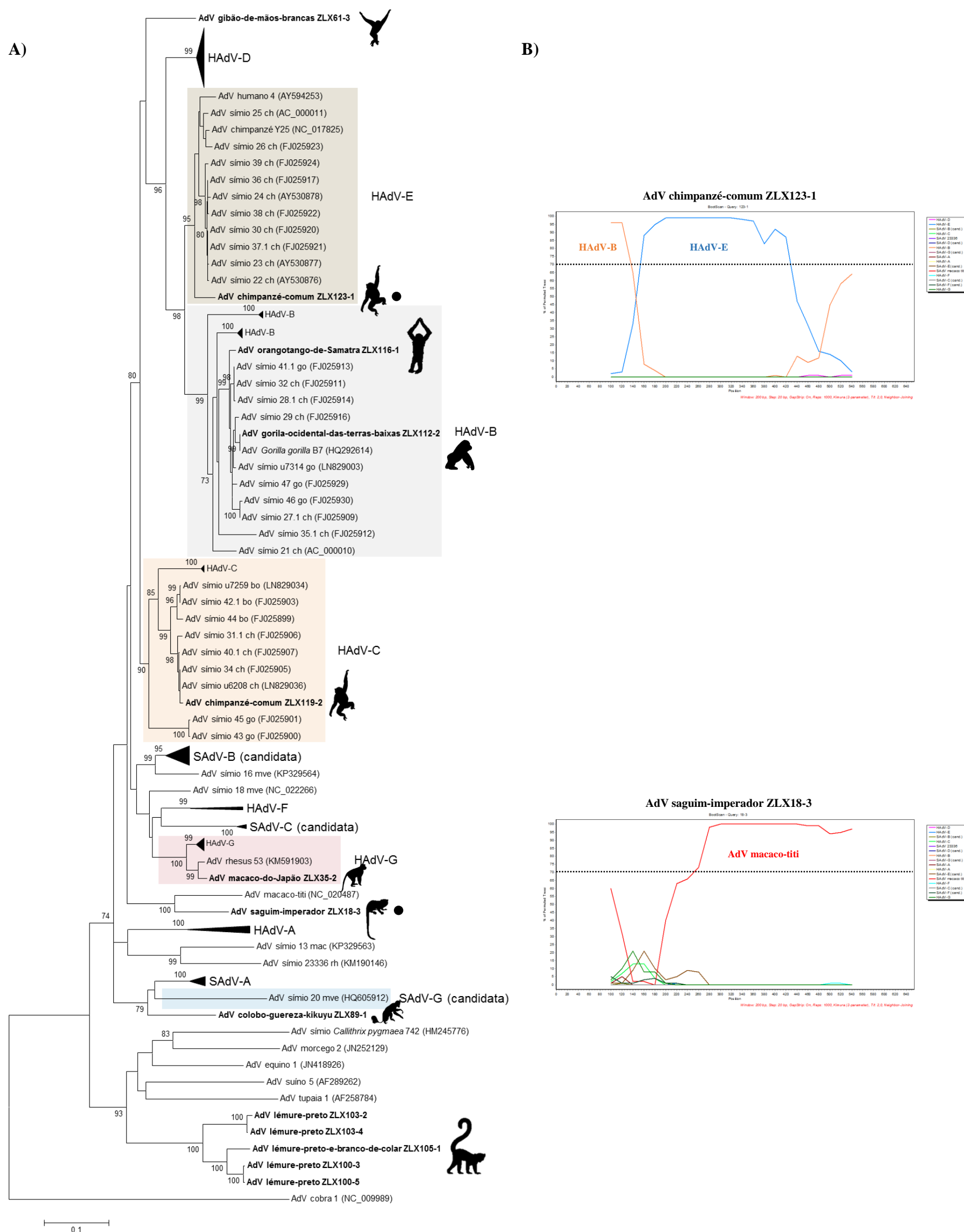


Figura 3.7 A) Árvore filogenética de adenovírus (AdV), construída pelo método *Neighbor-Joining*, baseada em sequências codificadoras da DNA polimerase. Foram utilizadas sequências humanas e símias classificadas e não classificadas e sequências do estudo (n=13) e estão identificadas com origem humana ou símia, tipo ou nome de estirpe/isolado, se aplicável primeiro hospedeiro onde foi identificado (ch-chimpanzé; go-gorila; bo-bonobo; mve-macaco verde; mac-*Macaca* sp., espécie não identificada; rh-macaco *rhesus*) e número de acesso entre parêntesis. As sequências do estudo encontram-se destacadas a negrito. A indicação de algumas espécies de AdV é feita com retângulos coloridos. A percentagem de árvores replicadas na qual as sequências associadas agruparam no teste de *bootstrap* (1000 replicados) é apresentada junto aos ramos ($\geq 70\%$). A árvore está desenhada à escala. As distâncias evolutivas foram calculadas com base no método de 2 parâmetros de Kimura. A análise envolveu 158 sequências com um total de 557 posições nucleotídicas. A análise evolutiva foi executada no programa MEGA 6. **B)** Análise de *bootscanning* (janela 200 pb; passos 20 pb; 1000 replicados), executada em *SimPlot* v3.5.1, das 2 sequências assinaladas (bola preta). Encontra-se identificado no gráfico (linha preta pontilhada horizontal) o valor 70%.

De um modo geral, a topologia da árvore construída apresenta elevada qualidade. Com exceção do AdV símio *Callithrix pygmaea* 742, mas cuja localização topológica está congruente com a encontrada pelos autores (Gál *et al.*, 2013), é possível observar claramente a separação entre sequências de AdVs de primatas e de AdVs de não primatas. Mais importante ainda, é evidente a existência dos 10 grupos monofiléticos suportados por valores de *bootstrap* elevados ($\geq 90\%$) correspondentes às espécies de AdVs de primatas estabelecidas (HAdV-A a G e SAdV-A) e em fase de avaliação (SAdV-B e SAdV-C). No que respeita a AdVs não classificados (AdV macaco-titi e AdV símio 23336) ou com proposta recente de criação de novas espécies (SAdV-13, -16, -18 e -20), estes encontram-se em ramos filogenéticos separados como seria expectável. Ainda, dentro de cada grupo monofilético, regra geral, AdVs provenientes de espécies de hospedeiros distintas agrupam separadamente.

Relativamente às sequências do estudo, as 5 sequências de AdVs provenientes de lémures (AdV lémure-preto ZLX103-2 e ZLX103-4, AdV lémure-preto ZLX100-3 e ZLX100-5, e AdV lémure-preto-e-branco-de-colar ZLX105-1) formam um grupo monofilético distinto (valor de *bootstrap* de 100%) e mais próximo de AdVs de hospedeiros não primatas, surgindo agrupadas com estes com um valor de *bootstrap* de 93%. De notar que sequências de vírus identificados em amostras diferentes da mesma espécie (AdV lémure-preto ZLX103-2 e ZLX103-4 e AdV lémure-preto ZLX100-3 e ZLX100-5) divergem significativamente como evidenciado pelo tamanho dos ramos. Inclusivamente, as sequências de AdVs de uma delas (AdV lémure-preto ZLX100-3 e ZLX100-5) estão mais próximas da de um AdV de uma outra espécie (AdV lémure-preto-e-branco-de-colar ZLX105-1).

A única sequência obtida proveniente de gibões, AdV gibão-de-mãos-brancas ZLX61-3, deu origem a um ramo isolado, constituindo uma sequência bastante divergente das incluídas na análise. Ainda assim, esta é filogeneticamente mais próxima das sequências constituintes dos grupos monofiléticos correspondentes às espécies HAdV-B, -C, -D e -E, que no seu conjunto surgem suportados por um valor de *bootstrap* de 80%.

No que respeita à única sequência DNA-Pol de AdVs obtida a partir de MNM, AdV saguim-imperador ZLX18-3, esta estimou-se mais próxima do ainda sem classificação AdV macaco-titi (valor de *bootstrap* de 100%), apesar da distância genética relativamente

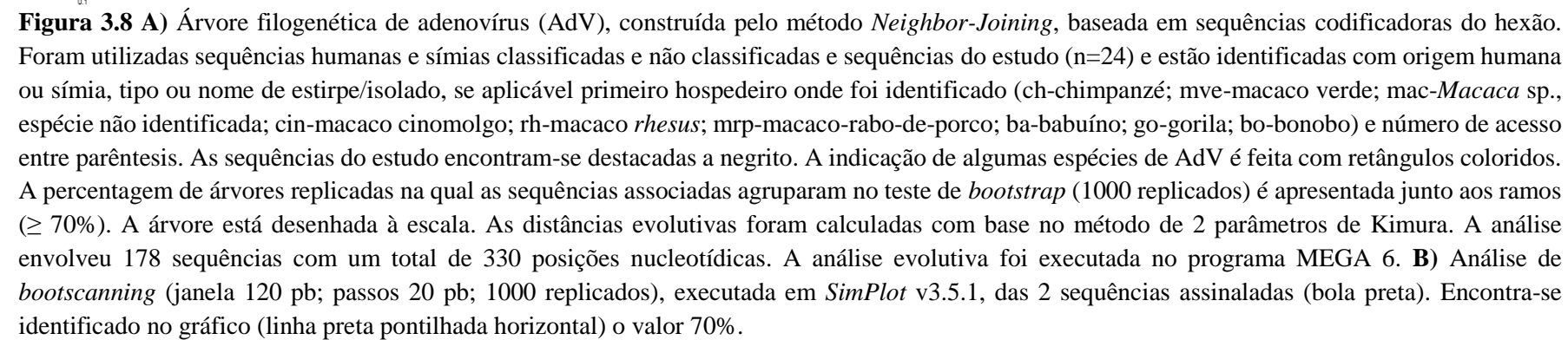
a um ancestral comum já seja considerável, como revelado pelo comprimento dos ramos na base das duas sequências.

Os AdV macaco-do-Japão ZLX35-2 e AdV colobo-guereza-kikuyu ZLX89-1 são AdVs com origem em MVM. O primeiro foi incluído no grupo monofilético formado por membros da espécie HAdV-G, sendo o AdV rhesus 53 o mais próximo filogeneticamente (valor de *bootstrap* de 99%). Por sua vez, o segundo representa uma sequência divergente, com maior proximidade filogenética relativamente às sequências constituintes da espécie SAdV-A e do SAdV-20 (candidato à criação da espécie SAdV-G) (valor de *bootstrap* de 79%).

Por fim, as 4 sequências provenientes de grandes símios apresentaram alguma heterogeneidade. A sequência AdV chimpanzé-comum ZLX123-1 foi estimada como membro da espécie HAdV-E (valor de *bootstrap* de 95%), apesar de constituir uma sequência divergente comparativamente com os restantes elementos. O AdV chimpanzé-comum ZLX119-2 foi incluído na espécie HAdV-C, com maior proximidade aos SAdV-31.1, -40.1, -34 e isolado AdV símio u6208 (valor de *bootstrap* de 98%). O AdV orangotango-de-Samatra ZLX116-1 surge posicionado na espécie HAdV-B (valor de *bootstrap* de 99%), assim como o AdV gorila-ocidental-das-terras-baixas ZLX112-2. Este último, por sua vez, face ao comprimento dos ramos, deverá ser uma estirpe muito similar à do AdV *Gorilla gorilla* B7 nesta região do genoma (valor de *bootstrap* de 99%).

3.4.2. Relações filogenéticas baseadas em sequências do hexão

Para a análise das relações filogenéticas entre os novos AdVs detetados no estudo e sequências de referência de AdVs, foram adicionadas às 24 sequências nucleotídicas obtidas para o gene do hexão, 154 sequências correspondentes depositadas nas bases de dados (Anexo 5). Assim, no total, foram tidas em conta 178 sequências parciais do gene do hexão (330 posições nucleotídicas) na construção da árvore filogenética (Figura 3.8A).



A árvore filogenética obtida com base em sequências nucleotídicas do gene do hexão apresenta na generalidade boa qualidade em termos topológicos e, à semelhança da árvore relativa à DNA-Pol, é clara a separação entre as sequências de AdVs de primatas e não primatas obtidas como referência para inclusão na análise. Novamente, na maioria dos casos, a demarcação entre espécies de AdVs estabelecidas ou em fase de candidatura é suportada por valores de *bootstrap* elevados ($\geq 78\%$), assim como o aparecimento em ramos filogenéticos separados de AdVs não classificados ou com proposta recente de criação de espécies. A exceção ocorre com as sequências anteriormente identificadas como pertencentes a tipos ou membros das espécies HAdV-G e SAdV-A e -C (candidata), não sendo possível definir com consistência grupos monofiléticos correspondentes a estas espécies.

No que diz respeito às sequências de AdVs do estudo, as 7 sequências obtidas de lêmures (AdV lémure-preto ZLX100H1 e ZLX103H5, AdV lémure-de-cauda-anelada ZLX96H3 e ZLX97H1, AdV lémure-preto-e-branco-de-colar ZLX104H1, ZLX105H2 e ZLX108H4) formam um grupo monofilético afastado, suportado por um valor de *bootstrap* de 84%, bem separado dos restantes AdVs de primatas incluídos e aparentemente mais próximo de AdVs de não primatas, mais especificamente de ovinos e suínos. Com exceção da sequência AdV lémure-preto-e-branco-de-colar ZLX104H1 que surge num ramo isolado e bastante divergente, as diferentes sequências de AdVs de lêmures surgem associadas de acordo com a espécie de proveniência.

As sequências de AdVs provenientes de gibões (AdV siamango ZLX45H1 e ZLX75H3, e AdV gibão-de-mãos-brancas ZLX61H1 e ZLX62H1) formam um grupo monofilético distinto (valor de *bootstrap* de 100%), agrupando-se diferencialmente em função da respetiva espécie de gibão.

AdV saguim-imperador ZLX18H5 e ZLX19H1, únicas sequências de AdVs conseguidas a partir de MNM, possuem ramos muito curtos ou inexistentes e revelaram-se filogeneticamente iguais. O AdV macaco-titi é o que apresenta maior proximidade filogenética (valor de *bootstrap* de 91%), ainda que com alguma distância genética.

Com origem em MVM, foram avaliadas as relações filogenéticas de 5 sequências de AdVs. AdV colobo-guereza-kikuyu ZLX83H4 e ZLX89H1 agruparam conjuntamente (valor de *bootstrap* de 100%) e surgem próximas de AdV *Piliocolobus badius* 3, formando um grupo suportado por um valor de *bootstrap* de 99%. No caso dos AdV

macaco-do-Japão ZLX35H1 e AdV langur-de-Java ZLX7H5, devido ao seu posicionamento, são apontados como membros prováveis da espécie HAdV-G, apesar de não existir suporte pelos valores de *bootstrap* obtidos ($\leq 68\%$). Ainda proveniente de MVM, foi detetado o AdV macaco-de-nariz branco ZLX60H5 em que foi calculada uma maior proximidade filogenética ao SAdV-16. A sequência deste último ficou muito recentemente disponível e este AdV foi indicado como único elemento descrito candidato para a criação da espécie SAdV-E.

Por último, foram analisadas relativamente à sua história evolutiva 6 sequências de AdVs provenientes de grandes símios. O AdV chimpanzé-comum ZLX123H5 foi incluído na espécie HAdV-E (valor de *bootstrap* de 99%) enquanto os AdV chimpanzé-comum ZLX119H2 e ZLX127H5, filogeneticamente iguais, surgem como elementos da espécie HAdV-B, também iguais em termos filogenéticos ao SAdV-21 (valor de *bootstrap* de 99%). Os AdV orangotango-de-Samatra ZLX116H1 e AdV gorila-ocidental-das-terras-baixas ZLX112H1 foram igualmente identificados como elementos da espécie HAdV-B, com maior proximidade ao SAdV-32 (valor de *bootstrap* de 99%) e SAdV-41.1 (valor de *bootstrap* de 99%), respetivamente. Por sua vez, o AdV orangotango-de-Samatra ZLX118H1 constitui uma sequência divergente tendo maior proximidade com a espécie HAdV-C (valor de *bootstrap* de 84%).

3.4.3. Comparação das relações filogenéticas baseadas em sequências da DNA polimerase e do hexão

Tendo em conta a existência de informação relativa a ambas as regiões codificadoras para AdVs de 11 amostras distintas, correspondentes a 13 sequências codificadoras da DNA-Pol e 11 do hexão, considerou-se pertinente a comparação da localização topológica das diferentes sequências virais nas duas árvores filogenéticas construídas.

No caso dos AdVs de lémures, foram encontrados posicionamentos concordantes em ambas as árvores, com a criação de um grupo monofilético isolado e filogeneticamente mais próximo de AdVs provenientes de hospedeiros não primatas, representando um grupo bastante distinto dos AdVs utilizados na avaliação das relações filogenéticas. Dentro do grupo, é notória a diferença de localização dos AdVs de lémures-pretos. Com base na árvore construída com sequências do hexão, os AdVs detetados em duas amostras (AdV lémure-preto ZLX100 e ZLX103) formam um grupo, sendo o momento de

divergência bastante recente em termos evolutivos. Contudo, na árvore baseada em sequências da DNA-Pol, pela localização dos AdVs provenientes das mesmas amostras, é indicado um momento de divergência bastante mais precoce.

À semelhança dos anteriores, o AdV detetado em gibões (AdV gibão-de-mãos-brancas ZLX61) deu origem a um ramo isolado na árvore da DNA-Pol e à inclusão num grupo monofilético constituído exclusivamente por sequências de AdVs de gibões na árvore do hexão, sendo inferido a partir de ambas a identificação de sequências de AdVs bastante diferentes das restantes no que respeita a evolução genética.

O posicionamento em ambas as árvores das sequências de AdVs detetadas a partir de um saguim-imperador (MNM) é concordante e apoia a proximidade filogenética deste AdV com o ainda não classificado AdV macaco-titi.

Relativamente a AdVs identificados em MVM, é possível estabelecer comparação entre sequências provenientes de duas espécies diferentes. O AdV identificado no macaco-do-Japão é indubitavelmente incluído na espécie HAdV-G quando se analisa a sequência da DNA-Pol, com maior proximidade filogenética ao AdV rhesus 53. Por sua vez, a partir da sequência nucleotídica do hexão, a situação não é clara mas é percebida a probabilidade de estar realmente classificado nesta espécie uma vez que se situa num grupo onde estão incluídas sequências da espécie HAdV-G. O AdV identificado num colobo-guereza-kikuyu é filogeneticamente próximo do AdV *Ptilocolobus badius* 3 pela estimativa baseada nas sequências do hexão. Contudo, esta relação não foi confirmada para a sequência da DNA-Pol devido a inexistência de sequência pública da DNA-Pol para este último AdV. Ainda assim, pelo comprimento do ramo da sequência na árvore construída com base em sequências da DNA-Pol, foi constatada a presença de uma estirpe de AdV divergente.

Dentro das sequências de AdVs identificadas em amostras de grandes símios, foi possível a comparação de inferências para 4 delas. Com base em ambas as árvores, o AdV chimpanzé-comum ZLX123 é classificado como elemento da espécie HAdV-E. Porém, enquanto na árvore do hexão surge integrado no seio dos restantes tipos da espécie, na árvore da DNA-Pol situa-se num ramo bem separado, que poderá representar um tipo distinto dos estabelecidos dentro da espécie. O AdV orangotango-de-Samatra ZLX116 é identificado como elemento da espécie HAdV-B, existindo concordância entre as árvores, e destacando-se a proximidade filogenética com a sequência nucleotídica do hexão do

SAdV-32, não confirmada para DNA-Pol. O AdV gorila-ocidental-das-terras-baixas ZLX112 estimou-se ser classificado como elemento da espécie HAdV-B. No entanto, pela sequência da DNA-Pol é, em termos filogenéticos, igual ao AdV *Gorilla gorilla* B7, enquanto pela sequência do hexão é mais próximo do SAdV-41.1 e claramente separado do AdV *Gorilla gorilla* B7, também incluído na estimativa. Finalmente, o AdV chimpanzé-comum ZLX119 é identificado como pertencente à espécie HAdV-C com base na sequência da DNA-Pol e à espécie HAdV-B, filogeneticamente idêntico ao SAdV-21, de acordo com a sequência do hexão.

3.4.4. Análise de sequências divergentes

Durante a análise das árvores filogenéticas construídas com base nas sequências nucleotídicas parciais da DNA-Pol e do hexão, foi observado que algumas sequências do estudo deram origem a ramos filogenéticos isolados ou que traduziram uma elevada distância genética a um ancestral comum num grupo monofilético. A aplicação do método de *bootscanning*, através do programa *SimPlot*, permitiu esta análise, sendo considerados significativos valores de *bootstrap* $\geq 70\%$. Como sequências de referência, foram incluídas até 12 sequências de cada espécie de AdVs. No caso de espécies com mais de 12 tipos estabelecidos, selecionaram-se as sequências em função da sua localização topológica nas árvores filogenéticas construídas e, em caso de dúvida, dando-se preferência a sequências com origem em hospedeiros símios.

Assim, para a região codificadora da DNA-Pol foi feita a análise de sequências divergentes constituintes dos seguintes AdVs: AdV saguim-imperador ZLX18-3, AdV gibão-de-mãos-brancas ZLX61-3, AdV colobo-guereza-kikuyu ZLX89-1 e AdV chimpanzé-comum ZLX123-1. A análise dos três primeiros não mostrou indícios claros da presença de eventos de recombinação. Contudo, é de salientar que a análise do AdV saguim-imperador ZLX18-3 mostrou que a sequência que o constitui é mais próxima do AdV macaco-titi apenas em parte da sua sequência (posições 244 a 540), sendo a porção genómica restante (posições 100 a 243) divergente de todas as sequências de referência incluídas (Figura 3.7B). Por outro lado, para o AdV chimpanzé-comum ZLX123-1 foi encontrada evidência de recombinação, com um segmento genómico 5' (posições 100 a 136) mais próximo de membros da espécie HAdV-B, seguido de outro (posições 153 a 428) de membros da espécie HAdV-E e um segmento 3' (posições 429 a 540) que não se

apresenta significativamente próximo de nenhum dos membros incluídos, contudo parece existir uma tendência crescente de similaridade novamente à espécie HAdV-B (Figura 3.7B).

Relativamente às sequências nucleotídicas do hexão, foram analisados os seguintes AdVs: AdV langur-de-Java ZLX7H5, AdV saguim-imperador ZLX18H5, AdV saguim-imperador ZLX19H1, AdV macaco-do-Japão ZLX35H1, AdV colobo-guereza-kikuyu ZLX83H4, AdV colobo-guereza-kikuyu ZLX89H1 e AdV orangotango-de-Samatra ZLX118H1. Não foi encontrada evidência da presença de eventos de recombinação de genomas para qualquer uma delas. Curiosamente, apesar de não se verificar suporte por valores de *bootstrap*, esta análise mostrou que o AdV langur-de-Java ZLX7H5 possui uma região (posições 60 a 223) mais próxima de membros da espécie SAdV-C (candidata) e outra (posições 224 a 330) mais próxima de membros da espécie HAdV-F (Figura 3.8B), não sendo mais próxima da espécie HAdV-G em segmento algum como anteriormente parecia sugerir a árvore filogenética (Figura 3.8A). É de realçar ainda que os resultados da análise do AdV orangotango-de-Samatra ZLX118H1 justificam a sua localização na árvore filogenética, uma vez que se tornou evidente que parte da sua sequência (posições 85 a 190) é mais próxima de elementos da espécie HAdV-C enquanto a restante (posições 191 a 340) diverge de todas as sequências de referência incluídas na análise (Figura 3.8B).

4. Discussão e Conclusões

4. Discussão e Conclusões

A pesquisa e caracterização de adenovírus (AdVs) em primatas não humanos (PNH) tem sido alvo de bastante interesse nos últimos anos, com consequente revelação de uma diversidade genética imensa. Ainda que a sua potencial utilização como vetores alternativos de vacinação, terapia génica e oncoterapia possa ter sido o maior impulsionador destes estudos (Abbink *et al.*, 2015; Capone *et al.*, 2013; Colloca *et al.*, 2012), a informação obtida também interessa do ponto de vista da emergência de potenciais agentes patogénicos considerando as evidências de transmissões inter-espécies envolvendo seres humanos (Chen *et al.*, 2011; Chiu *et al.*, 2013) e o número de AdVs com genomas recombinantes tendo segmentos com origem em adenovírus humanos (HAdVs) e símios (SAdVs) (Dehghan *et al.*, 2013a, 2013b; Zhou *et al.*, 2014), entre os quais HAdVs patogénicos. Se por um lado têm sido descobertos novos SAdVs na sequência de manifestações clínicas, por outro a deteção em animais assintomáticos é a que mais tem contribuído para este conhecimento, refletindo a diversidade de AdVs estabelecida no viroma. Apesar de ser extremamente interessante a pesquisa em hospedeiros na vida selvagem de modo a avaliar a história evolutiva natural do vírus, nomeadamente a origem das espécies de HAdVs, o conhecimento da diversidade existente em animais cativos também é interessante. O estado de cativeiro pode favorecer a transferência de vírus entre seres humanos e PNH e mesmo entre espécies que na natureza não se cruzariam e, em termos práticos, confere maior facilidade de acesso a produtos biológicos para análise. Com este estudo pretendeu-se detetar e fazer uma caracterização preliminar de AdVs presentes em amostras fecais de PNH cativos no Jardim Zoológico de Lisboa, através da amplificação por *nested*-PCR de sequências parciais dos genes virais da DNA polimerase (DNA-Pol) e proteína do hexão, sequenciação dos amplicões e análise filogenética das sequências obtidas. Paralelamente, procedeu-se à inoculação de culturas celulares para isolamento dos vírus eventualmente presentes.

A amplificação de uma região altamente conservada do gene da DNA-Pol teve como objetivo assegurar uma ampla deteção de AdVs e como de acordo com o Comité Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) a percentagem de divergência deste gene é usada como critério importante de demarcação das espécies de AdVs (Harrach *et al.*, 2011), também identificar tentativamente as espécies virais detetadas. Adicionalmente, a amplificação de uma sequência nucleotídica relativamente conservada codificadora da

região N-terminal da proteína do hexão aumentou a sensibilidade da detecção de vírus. Como nos AdVs a especificidade de tipo está bem correlacionada com variações da sequência do hexão (Ebner *et al.*, 2005; Madisch *et al.*, 2005), a amplificação desta região do genoma viral, para além de ser um método de detecção genérico bastante utilizado (Foytich *et al.*, 2014; Hoppe *et al.*, 2015a; Wevers *et al.*, 2011), poderia possibilitar também uma identificação de tipo. Contudo, é de salientar que o tamanho das sequências amplificadas é limitativo, uma vez que foram analisadas apenas 557 e 330 posições nucleotídicas, respetivamente para a DNA-Pol e hexão, permitindo obter apenas uma classificação preliminar. Para ambos os genes, observou-se variação do número de nucleótidos das sequências obtidas relativamente ao tamanho esperado. Tendo em conta que esta variação foi sempre em tripletos de nucleótidos, *i.e.* codões, e que se verificou maioritariamente a associação das sequências com o mesmo número de nucleótidos a um determinado hospedeiro de origem, esta variabilidade refletirá a ocorrência de inserções e/ou deleções de aminoácidos inerentes à evolução natural dos vírus. É ainda relevante mencionar a frequente incapacidade em obter amplicões para os dois genes numa mesma amostra, mesmo nos casos em que foi confirmada por sequenciação de DNA a presença do vírus. Este facto poderá dever-se à presença de sequências alvo muito divergentes relativamente à dos *primers* usados, impedindo o seu emparelhamento e, consequentemente, a reação de amplificação.

Para a globalidade das amostras fecais analisadas obteve-se uma taxa de detecção de AdVs de 82,8%. Taxas elevadas de detecção de AdVs em fezes de primatas cativos em jardins zoológicos e centros de investigação e em liberdade no seu ambiente natural foram descritas por vários autores mas, de um modo geral, com valores inferiores (Bányai *et al.*, 2010; Hoppe *et al.*, 2015a; Roy *et al.*, 2009; Seimon *et al.*, 2015; Wevers *et al.*, 2011). No entanto, convém notar que o valor obtido neste trabalho se baseia na observação de amplicões com um determinado tamanho, os quais não foram todos confirmados por sequenciação como sendo provenientes de AdVs. A utilização de *primers* degenerados permitiu a amplificação inespecífica de fragmentos nucleotídicos com a mesma dimensão mas derivados de outras entidades biológicas (*e.g.* bactérias, fungos, plantas) identificadas por sequenciação (Anexo 4), originando falsos positivos e, consequentemente, uma sobre-estimativa da taxa de detecção. Por outro lado, vírus pouco abundantes ou muito divergentes também poderão não ter sido detetados. Do ponto de

vista das diferentes categorias do hospedeiro primata de origem, *i.e.* grandes símios, gibões, macacos do Velho Mundo (MVM), macacos do Novo Mundo (MNM) e lémures, observou-se alguma variação dos valores detetados.

Genericamente, as árvores filogenéticas estimadas com base em sequências nucleotídicas dos genes da DNA-Pol e do hexão apresentaram-se concordantes entre si e com topologias gerais idênticas às reveladas por outros trabalhos (Abbink *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2011; Davison *et al.*, 2003; Pantó *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2009; Wevers *et al.*, 2010, 2011). Apesar de, na grande maioria, a separação de espécies de AdVs ter dado origem a grupos monofiléticos suportados por valores de *bootstrap* elevados ($\geq 70\%$), a árvore com sequências nucleotídicas do hexão apresentou-se com qualidade inferior relativamente à árvore da DNA-Pol, tendo especialmente em conta a mistura das sequências estabelecidas nas espécies G humana (HAdV-G) e C símia (SAdV-C) (candidata), não sendo criados grupos monofiléticos consistentes nestes casos. Todavia, uma situação semelhante envolvendo sequências do gene do hexão das mesmas espécies foi anteriormente descrita (Pantó *et al.*, 2015). Globalmente, à semelhança de trabalhos anteriores similares (Bányai *et al.*, 2010; Hoppe *et al.*, 2015a; Roy *et al.*, 2009; Seimon *et al.*, 2015; Wevers *et al.*, 2011), foi encontrada uma elevada diversidade genética, com distribuição de AdVs por espécies humanas e símias e com obtenção de sequências altamente divergentes das já identificadas.

A identificação de AdVs em animais independentes ou grupos que englobam grandes símios e MVM tem sido a mais descrita na literatura e, como tal, é para estas duas categorias que existe mais informação disponível. Possivelmente a estreita proximidade filogenética relativamente ao Homem e a utilização como modelos animais em centros de investigação contribuirá para um maior foco nestes dois grandes grupos de primatas. Para além disso, com base em variáveis tais como relação filogenética, existência de sobreposição na distribuição geográfica e partilha de agentes patogénicos entre primatas selvagens e seres humanos, foi estimada que a ocorrência de transmissões interespecíficas de agentes patogénicos, com consequente emergência de novas doenças, seja mais provável em regiões de África central e ocidental (Pedersen & Davies, 2009), onde se localizam naturalmente estes primatas.

A deteção presuntiva de AdVs em 88,2% das amostras fecais provenientes de grandes símios do Jardim Zoológico de Lisboa constitui um valor superior aos geralmente

encontrados noutros estudos que calcularam taxas de detecção de 91-100% em centros de investigação e 36-63% em zoos (Roy *et al.*, 2009) e compreendidas entre 38 e 94% em habitat natural (Hoppe *et al.*, 2015a; Roy *et al.*, 2009; Seimon *et al.*, 2015). Neste grupo de hospedeiros, analisaram-se 10 sequências de AdVs provenientes de 6 amostras distintas (4 amostras com amplicões dos genes da DNA-Pol e do hexão e 2 amostras com amplicões do gene do hexão). O AdV gorila-ocidental-das-terras-baixas ZLX112 revelou-se um elemento da espécie HAdV-B e filogeneticamente mais próximo dos AdV *Gorilla gorilla* B7 e SAdV-41.1, consoante o gene analisado é DNA-Pol ou hexão, respetivamente (Figura 3.7A, Figura 3.8A). O primeiro foi originalmente descoberto num gorila em cativeiro no Jardim Zoológico de Münster, Alemanha, com diarreia prolongada e doença respiratória auto-limitante, e um vírus aparentemente idêntico foi detetado num gorila selvagem do Gabão (Wevers *et al.*, 2010). O SAdV-41.1 foi identificado no contexto da descoberta de 30 novos AdVs de grandes símios e o seu hospedeiro de origem é um gorila (*Gorilla gorilla*) cativo no Jardim Zoológico de Buffalo, Estados Unidos da América (E.U.A.) (Roy *et al.*, 2009). Tendo em conta que apenas estão envolvidos gorilas como hospedeiros dos AdVs mencionados, poderá conjecturar-se que estes infetem naturalmente gorilas, podendo o quadro de doença apresentado na origem da descoberta do AdV *Gorilla gorilla* B7 estar eventualmente associado a um estado de imunodepressão ou os sintomas serem derivados de um agente etiológico desconhecido. A maior similaridade filogenética com AdVs distintos em função do gene analisado pode ser explicada por mais do que um fator, nomeadamente pela eventual existência de um evento de recombinação intraespecífica entre AdVs da espécie HAdV-B. O próprio AdV *Gorilla gorilla* B7 apresenta uma estreita similaridade com SAdV-29 (genoma completo, exceto as ansas hipervariáveis do hexão) e com SAdV-35.1 (nas ansas do hexão), sugerindo ter origem num evento de recombinação (Wevers *et al.*, 2010). O AdV gorila-ocidental-das-terras-baixas ZLX112 surge na região da DNA-Pol aparentemente próximo de AdV *Gorilla gorilla* B7 e SAdV-29 (Figura 3.7A). No entanto, na região do hexão analisada, que não inclui as ansas, surge num subgrupo completamente distinto tanto de AdV *Gorilla gorilla* B7 como de SAdV-35.1, sugerindo eventos de recombinação adicionais (Figura 3.8A). Eventos de recombinação foram igualmente descritos para outros AdVs da espécie HAdV-B de chimpanzés em cativeiro (SAdV-27.1) (Roy *et al.*, 2009) e de gorilas selvagens (Hoppe *et al.*, 2015b). Outra justificação para esta diferença de

posicionamento nas árvores filogenéticas das duas regiões genômicas poderá ser a obtenção de amplicões a partir de AdVs distintos que co-infetem o mesmo animal. Seimon e colaboradores (2015) detetaram co-infecção por mais de um tipo de AdVs em 16,4% (26/159, 6 chimpanzés e 20 gorilas) de amostras fecais de chimpanzés e gorilas em liberdade na República Democrática do Congo. A elucidação desta questão relativamente ao AdV gorila-ocidental-das-terras-baixas ZLX112 passará pela sequenciação do genoma viral completo ou do fragmento subgenômico entre os dois genes.

A partir de 3 chimpanzés-comuns foram identificados AdVs que se mostraram relacionados com as espécies HAdV-B, -C e -E (Figura 3.7A, Figura 3.8A). O AdV chimpanzé-comum ZLX123, para a região da DNA-Pol, foi identificado por *bootscanning* como sendo um recombinante composto por sequências nucleotídicas de AdVs das espécies HAdV-B e -E (Figura 3.7B). Relativamente à sequência nucleotídica do hexão, os AdV chimpanzé-comum ZLX119 e ZLX127 são filogeneticamente iguais e idênticos ao SAdV-21, igualmente derivado de chimpanzé, surgindo posicionados dentro da espécie HAdV-B (Figura 3.8A). Porém, o AdV chimpanzé-comum ZLX119 poderá possuir um genoma recombinante uma vez que a sequência da DNA-Pol amplificada da mesma amostra surge como espécie HAdV-C (Figura 3.7A), próxima dos SAdV-31.1, -40.1 e -34 identificados por Roy e colaboradores (2009) e do AdV símio u6208, estirpe identificada recentemente por Hoppe e colaboradores (2015a). Os primeiros foram identificados igualmente em chimpanzés, cativos no centro de investigação de Louisiana, E.U.A. (Roy *et al.*, 2009), enquanto o último foi identificado num chimpanzé (*Pan troglodytes verus*) selvagem da Costa do Marfim (Hoppe *et al.*, 2015a). A recombinação entre membros de diferentes espécies de AdVs foi descrita para o HAdV-4 que possui parte da sequência do hexão de HAdV-16 (espécie HAdV-B) inserida num genoma da espécie HAdV-E derivado do SAdV-26 de chimpanzé (Dehghan *et al.*, 2013b). Novamente, este potencial evento de recombinação poderá ser elucidado através da sequenciação de um fragmento subgenômico entre os dois genes ou do genoma completo. Ainda, a coerência relativamente aos hospedeiros de origem dos AdVs mais próximos e a presença tanto em animais no estado selvagem como em cativeiro leva a considerar a infecção natural por estes AdVs na espécie em causa.

Finalmente, ainda nos grandes símios, pela primeira vez foram obtidas sequências nucleotídicas de AdVs provenientes de orangotangos, apesar de previamente ter sido detetada por PCR (taxa de deteção de 63%) a sua presença num grupo de orangotangos (*Pongo pygmaeus*) cativo num jardim zoológico nos E.U.A. e tentado o seu isolamento sem sucesso (Roy *et al.*, 2009). Os AdVs identificados em dois orangotangos-de-Samatra, através da amplificação da região do hexão, revelaram-se bastante distintos entre si, com a identificação de uma sequência divergente e de outra classificada como espécie HAdV-B (Figura 3.8A). O AdV orangotango-de-Samatra ZLX118 poderá constituir um tipo novo, com alguma proximidade à espécie HAdV-C, contudo parte da sua sequência é totalmente diferente das sequências das espécies de referência usadas (Figura 3.8B). Outra possibilidade que não pode ser completamente excluída respeita a um fenómeno de recombinação entre uma estirpe viral desconhecida e um elemento da espécie HAdV-C. Por sua vez, o AdV orangotango-de-Samatra ZLX116 possui uma sequência genómica parcial do hexão mais próxima do SAdV-32 identificado originalmente num chimpanzé cativo num centro de investigação de Louisiana, E.U.A. (Roy *et al.*, 2009). A distância evolutiva calculada entre os dois relativamente ao ancestral comum revelou-se curta. Considerando a descrição de potenciais casos de transmissão entre espécies de grandes símios (Hoppe *et al.*, 2015a, 2015b; Wevers *et al.*, 2010), a definição de tipos em função da sequência do hexão (Berk, 2013; Echavarría, 2015; Russell, 2009; Wold & Ison, 2013) e o facto de habitualmente a infeção por determinado tipo ser restrita a uma espécie hospedeira (Davison *et al.*, 2003) poderá levar-se a conjecturar um eventual salto deste AdVs entre hospedeiros de espécies diferentes, num passado recente, cujas distâncias evolutivas terão surgido no sentido de adaptação ao novo hospedeiro. Tendo em conta que, na natureza, os géneros *Pongo* (orangotangos) e *Pan* (chimpanzés) se localizam em continentes separados (Pecon-Slaterry, 2014), a ocorrer um evento de transmissão do vírus este teria lugar num contexto de cativeiro que permitisse o contato entre os dois géneros. Contudo, será necessária mais informação sobre o genoma viral de modo a avaliar esta hipótese. Uma vez que quando da inoculação de células A549 se detetou por PCR a presença de genoma viral no sobrenadante de cultura, este vírus poderá ser isolado e sequenciado o seu genoma.

Relativamente aos primatas do Velho Mundo, obteve-se uma taxa de deteção de AdVs de 85,4%. Na literatura, para animais do género *Macaca* cativos em centros de

investigação estão descritos valores entre 13 e 100% (assintomáticos) (Lu *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2009) e 46% (sintomáticos) (Bányai *et al.*, 2010). Para além da identificação em *Macaca* sp., já foi detetada a presença de AdVs de MVM em espécies dos géneros *Colobus*, *Ptilocolobus*, *Papio*, *Chlorocebus* e *Cercopithecus* (Chiu *et al.*, 2013; Pantó *et al.*, 2015; Pauly *et al.*, 2015; Wevers *et al.*, 2011). Os MVM formam a família Cercopithecidae que se divide nas subfamílias Colobinae e Cercopithecinae. A primeira inclui os géneros *Colobus* da tribo africana Colobini e *Trachypithecus* da tribo asiática Presbytini, enquanto na segunda estão inseridos os géneros *Cercopithecus* (origem africana) da tribo Cercopithecini e *Macaca* (linhagem asiática, exceto *M. sylvanus*) da tribo Papionini (Pecon-Slattey, 2014). Neste trabalho foram confirmados, por sequenciação de DNA, AdVs de espécies dos 4 géneros símios mencionados, nomeadamente colobo-guereza-kikuyu, langur-de-Java, macaco-de-nariz-branco e macaco-do-Japão, respetivamente. Este poderá constituir o motivo pelo qual foi encontrada uma diversidade elevada de AdVs dentro desta categoria. É de realçar que esta é a primeira identificação de AdVs em macacos do género *Trachypithecus* (langur-de-Java).

O AdV macaco-do-Japão ZLX35 foi classificado claramente na espécie HAdV-G com base na sequência da DNA-Pol (Figura 3.7A). O AdV rhesus 53, identificado como elemento filogeneticamente mais próximo, foi descoberto por Abbink e colaboradores (2015), no contexto da identificação de novos AdVs potenciais vetores de vacinas, a partir de macacos *rhesus* infetados com SIV. Apesar de representarem espécies hospedeiras distintas, ambas pertencem ao género *Macaca* pelo que a deteção de AdVs semelhantes provenientes destas espécies não está fora de contexto. Porém, quando da análise da sequência do hexão, a inferência filogenética não suporta a inclusão numa espécie definida (Figura 3.8A) e quando da pesquisa de eventos de recombinação foi notória a sua divergência relativamente a todas as sequências incluídas na análise (dados não apresentados). A replicação do AdV macaco-do-Japão ZLX35 demonstrada em células Vero E6 permitirá o seu isolamento e subsequente obtenção e análise da sequência do genoma viral.

Os AdVs identificados em macacos colobo-guereza-kikuyu (ZLX83 e ZLX89) revelaram sequências divergentes das sequências das espécies oficialmente estabelecidas ou em fase de candidatura. Contudo, as suas sequências do hexão são filogeneticamente

mais próximas de uma identificada por Wevers e colaboradores (2011) num colobo-vermelho-ocidental que se encontrava no seu habitat natural. Esta espécie de primata inclui-se no género *Piliocolobus*, género filogeneticamente mais próximo do género *Colobus* (Pecon-Slaterry, 2014). Infelizmente, só se encontra disponibilizada a sequência do hexão, impossibilitando a comparação no que respeita à região codificadora da DNA-Pol. Tendo em conta a identificação prévia de um AdV estreitamente relacionado a partir de uma espécie hospedeira próxima e em liberdade, provavelmente este constituirá um AdV que infeta naturalmente este género e não representará um artefacto resultante da situação de cativeiro. Considerando a localização topológica do AdV colobo-guereza-kikuyu ZLX89 com base na sequência da DNA-Pol, que demonstra um afastamento substancial de outras espécies de AdVs (Figura 3.7A), e a sua análise por *bootscanning* que revelou ser uma sequência divergente, mas com maior proximidade filogenética às espécies SAdV-A e -G (candidata) (dados não apresentados), é possível que no futuro esteja na origem de criação de uma nova espécie de AdVs provenientes de MVM.

O AdV langur-de-Java ZLX7 surge na árvore filogenética do hexão entre vários membros classificados como HAdV-G mas sem suporte de valor de *bootstrap* significativo (Figura 3.8A). De facto, a análise de *bootscanning* revelou uma proximidade mais elevada com as espécies HAdV-F e SAdV-C (candidata) e muito reduzida com membros da espécie HAdV-G, apesar de ainda assim ser bastante diferente de todas as sequências incluídas na análise (Figura 3.8B). Estas incongruências poderão ser justificadas pela utilização de uma curta sequência nucleotídica do hexão que pode não permitir a separação de espécies de AdVs, como apontado anteriormente, impedindo a obtenção de inferências robustas referentes a esta sequência. De qualquer forma, tendo em conta que é a primeira deteção de sequências de AdVs num langur-de-Java, será importante o prosseguimento da análise deste vírus, nomeadamente, numa primeira fase, através da análise do gene da DNA-Pol.

Relativamente à sequência do hexão, o AdV macaco-de-nariz-branco ZLX60 foi identificado como filogeneticamente próximo do SAdV-16. Este foi isolado a partir de um macaco-verde, cuja sequência genómica foi recentemente determinada originando a proposta de criação da espécie SAdV-E (Pantó *et al.*, 2015). Estes hospedeiros estão relacionados na medida em que pertencem à mesma tribo que inclui todos os membros de origem africana, com divisão há cerca de 7 milhões de anos (Pecon-Slaterry, 2014).

Assim, considerando a teoria de coevolução entre vírus e hospedeiro inerente à evolução dos AdVs, a identificação de AdVs filogeneticamente próximos nas espécies hospedeiras supracitadas torna-se provável. Ademais, no Jardim Zoológico de Lisboa não estão presentes macacos-verde e na natureza não está descrita a existência de uma amplitude geográfica simpátrica entre as duas espécies (Kingdon & Butynski, 2008; Oates *et al.*, 2008), sendo provável a infecção natural do macaco-de-nariz-branco por um AdV próximo do SAdV-16 ou um salto do vírus para o ancestral comum das duas espécies hospedeiras no passado levando a uma evolução divergente. Com uma análise mais aprofundada, este poderá constituir o segundo tipo viral desta espécie recentemente proposta.

Considerando o agrupamento das sequências de AdVs com origem nas duas categorias de hospedeiros primatas mencionadas, *i.e.* grandes símios e MVM, verificou-se uma distribuição geral pelas espécies HAdV-B, -C, -E e -G e SAdV-E (candidata). Mais especificamente, AdVs provenientes de primatas de MVM classificaram-se nas espécies HAdV-G e SAdV-E (candidata), enquanto AdVs de grandes símios foram agrupados nas espécies HAdV-B, -C e -E. Estes resultados são concordantes com os descritos pela generalidade dos estudos de caracterização de SAdVs. Assim, AdVs de MVM têm sido mais frequentemente classificados nas espécies SAdV-A, -B (candidata) e -C (candidata) e HAdV-G (Abbink *et al.*, 2015; Bányai *et al.*, 2010; Chiu *et al.*, 2013; Foytich *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2011; Pantó *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2012; Wevers *et al.*, 2011). Ainda, a recém-proposta espécie SAdV-E é, até ao momento, constituída por um único elemento isolado a partir de um MVM (Pantó *et al.*, 2015). Por outro lado, os AdVs de grandes símios são maioritariamente incluídos nas espécies HAdV-B, -C e -E, sendo que os AdVs de gorilas tendem a classificar-se com maior frequência na espécie HAdV-B e os de chimpanzés nas HAdV-C e -E (Colloca *et al.*, 2012; Hoppe *et al.*, 2015a; McVey *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2009; Seimon *et al.*, 2015; Tong *et al.*, 2010; Wevers *et al.*, 2010, 2011). Assim, esta análise reforça a separação clara entre AdVs provenientes destas duas categorias de hospedeiro, com aproximação dos AdVs de grandes símios a espécies de AdVs humanas e os de MVM a espécies de AdVs compostas exclusivamente por vírus de origem símia. Na segunda situação, a exceção prende-se com a espécie HAdV-G. Contudo especula-se que o único tipo humano da espécie (HAdV-52) tenha resultado de um evento de transmissão zoonótica ou que seja um contaminante da cultura primária de

células de macaco utilizada para inoculação das amostras fecais do doente com gastroenterite (Jones II *et al.*, 2007; Wevers *et al.*, 2011).

A categorização filogenética dos AdVs de primatas e a consideração da sua proveniência em termos de espécies hospedeiras possibilita deduções relevantes no sentido de percepção da origem das diferentes espécies de AdVs. Neste trabalho, não foram identificados quaisquer AdVs classificados como espécies HAdV-A, -D e -F. Por sua vez, a espécie HAdV-B incluiu AdVs identificados em gorila-ocidental-das-terras-baixas, chimpanzé-comum e orangotango-de-Samatra; as espécies HAdV-C e -E incluem AdVs de chimpanzé-comum; e a espécie HAdV-G contém AdVs de macaco-do-Japão. Tal como tem vindo a ser referido ao longo do texto, é aceite pela comunidade científica que as diversas espécies de AdVs tiveram origem devido ao mecanismo de coevolução entre vírus e hospedeiro (Davison *et al.*, 2003), pelo que a especiação viral deveria refletir a especiação dos primatas. Contudo, é cada vez mais evidente para algumas espécies de HAdVs que este mecanismo exclusivamente não explica a diversidade encontrada, sendo cada vez mais reconhecida a importância da contribuição de transmissões interespecíficas em determinados momentos da história evolutiva. No que respeita às espécies HAdV-A, -D e -F, apesar de se encontrarem descritas deteções pontuais em grandes símios selvagens (Hoppe *et al.*, 2015a; Wevers *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2014), cujo contato com populações humanas era conhecido nalguns destes casos e colocada a hipótese de transmissões interespecíficas (Wevers *et al.*, 2011), a sua origem não tem sido associada a outros eventos deste tipo. Por outro lado, um estudo recente, que se focou especialmente na análise das relações filogenéticas entre AdVs das espécies HAdV-B, -C e -E, concluiu que a espécie HAdV-B tem origem zoonótica, sendo que o vírus terá sido originalmente um vírus de gorilas que, posteriormente, foi transmitido a seres humanos e a chimpanzés. O mesmo estudo demonstrou que a espécie HAdV-E terá tido origem em chimpanzés, ao contrário dos AdVs da espécie HAdV-C que deverão ter resultado de um processo de codivergência com os respetivos hospedeiros (Hoppe *et al.*, 2015a). No caso da espécie HAdV-G, tal como descrito anteriormente, a sua origem estará relacionada com MVM. Assim, neste trabalho, apesar de não terem sido utilizadas reações de amplificação específicas de espécie mas antes *primers* universais, a não identificação de AdVs nas espécies HAdV-A, -D e -F é concordante com as hipóteses que indicam a origem humana destes AdVs. Por outro lado, a continuação da identificação de AdVs de PNH nas espécies

HAdV-B, -C, -E e -G reforça as teorias que apresentam como base da sua origem a existência de eventos de transmissão entre hospedeiros a partir de PNH.

Relativamente aos AdVs de MNM do Zoo de Lisboa, obteve-se uma taxa de deteção de 67,5%. Apesar de conhecida a presença de AdVs em MNM, a sua identificação tem sido feita em animais isolados ou em pequenos grupos (Chen *et al.*, 2011; Gál *et al.*, 2013; Hall *et al.*, 2012; Wevers *et al.*, 2011), não existindo dados na literatura que permitam o cálculo de uma taxa passível de comparação. Neste trabalho, foi confirmada, por sequenciação de DNA, a presença de AdVs em amostras fecais de dois saguins-imperador. Na literatura está descrita a infeção por AdVs de macacos-titi (Chen *et al.*, 2011), saguim-cabeça-de-algodão (Hall *et al.*, 2012), saguim-leãozinho (Gál *et al.*, 2013), saguim-comum e saguim-de-beiço-branco (Wevers *et al.*, 2011). Estes hospedeiros encontravam-se em condições distintas mas todos no contexto de cativeiro, pelo que nenhum AdV de MNM foi até ao momento detetado na vida selvagem. Nalguns casos foram presumidos eventos de transmissão entre espécies, possivelmente os animais onde foram detetados não sendo os hospedeiros naturais do vírus (Chen *et al.*, 2011; Gál *et al.*, 2013). Apenas para o AdV dos macacos-titi está sequenciado o genoma viral completo e para os restantes estão disponíveis sequências parciais dos genes do hexão e/ou DNA-Pol. Os AdV saguim-imperador ZLX18 e ZLX19 revelaram-se filogeneticamente próximos do AdV macaco-titi (ou TMAV). Infelizmente, não foi possível a inclusão na análise das sequências dos AdVs encontrados em saguins devido a inexistência das porções genómicas correspondentes às estudadas neste trabalho. Os macacos-titi pertencem ao género *Callicebus* da família Pitheciidae, enquanto o saguim-imperador pertence ao género *Saguinus* da família Cebidae, pelo que o ancestral comum remota ao partilhado por todos os MNM (Pecon-Slaterry, 2014). A distância genética entre os hospedeiros poderá justificar a distância filogenética observada entre os AdVs em causa nas duas árvores filogenéticas (Figura 3.7A, Figura 3.8A). Tendo em conta que saltos para novos hospedeiros estão frequentemente associados a doença grave ou fatal (Chen *et al.*, 2011; Chiu *et al.*, 2013; Gál *et al.*, 2013) e que, por outro lado, um eventual período de adaptação longo, resultante da coevolução entre vírus e hospedeiro, origina normalmente quadros de doença ligeira ou infeção subclínica (Bányai *et al.*, 2010; Hall *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2011; Maluquer de Motes *et al.*, 2011; McVey *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2009, 2012; Seimon *et al.*, 2015; Tong *et al.*, 2010; Wevers *et al.*, 2010, 2011; Zohdy

et al., 2015), os AdVs aqui detetados poderão com maior probabilidade ser enquadrados na segunda situação.

Os MNM constituem a infraordem Platyrrhini que divergiu da infraordem Catarrhini, onde estão incluídos todos os outros símios e seres humanos, há cerca de 43 milhões de anos (Pecon-Slattey, 2014). Com o aumento do conhecimento acerca da diversidade genética dos AdVs de MNM, claramente com sequências divergentes de todas as espécies de AdVs de primatas estabelecidas, e com evidências de cumprimento dos critérios instaurados pelo ICTV para criação de novas espécies e assinaladas por Chen e colaboradores (2011) relativamente à análise do AdV macaco-titi, o estudo e avaliação mais completa destes AdVs provavelmente levará à criação oficial de uma nova espécie, eventualmente já constituída por mais do que um tipo viral. A inoculação de células Vero E6 com as amostras onde foram detetados os AdV saguim-imperador ZLX18 e ZLX19 não gerou efeito citopático (CPE) nem permitiu detetar genoma viral no sobrenadante de cultura. Com base na proximidade filogenética com o AdV macaco-titi e considerando que este foi propagado com êxito em células A549 (Chen *et al.*, 2011), a inoculação desta linha celular poderá permitir o isolamento daqueles vírus e subsequente caracterização.

Um outro resultado interessante no contexto deste estudo prende-se com a deteção de AdVs em gibões. Até agora não está descrita na literatura e não existem quaisquer sequências depositadas nas bases de dados relativas a AdVs com origem nestes animais. Os gibões constituem a família Hylobatidae, integrante da superfamília Hominoidea que inclui também o Homem e os grandes símios, e que se divide em quatro géneros, entre os quais *Hylobates* e *Symphalangus* (Pecon-Slattey, 2014). Na natureza, este grupo habita as florestas tropicais do Sudeste Asiático (China, Índia e Indonésia), existindo um único grau extenso de simpatria entre espécies da família que envolve siamangos (género *Symphalangus*) e membros do grupo *lar* (género *Hylobates*) (Geissmann, 2014). Foram obtidas sequências de AdVs representativas dos dois géneros referidos que se revelaram, em termos filogenéticos, próximas entre si e altamente divergentes das restantes sequências no caso do hexão, mas mais próximas (ainda que muito afastadas), na árvore filogenética da DNA-Pol, das espécies HAdV-B, -C, -D e -E (valor de *bootstrap* de 80%) (Figura 3.7A). Esta proximidade a confirmar-se estará em consonância com o facto de os gibões fazerem parte da superfamília Hominoidea juntamente com o Homem e os grandes símios. A localização topológica das sequências dos AdVs de gibões nas duas

árvores filogenéticas leva a considerar a hipótese de se tratar de uma nova espécie do género *Mastadenovirus*. Segundo o ICTV, o estabelecimento de uma nova espécie neste género requer uma distância filogenética > 5-15% baseada na sequência de aminoácidos da DNA-Pol (Harrach *et al.*, 2011), pelo que será prioritário a sequenciação do gene completo da DNA-Pol destes vírus ou mesmo todo o genoma.

Também no contexto deste trabalho, um outro resultado relevante foi a detecção de AdVs em prossímios. Até ao momento tinham sido feitas tentativas de detecção em lémures selvagens (Wevers *et al.*, 2011) e em lémures cativos em jardim zoológico (Zhou *et al.*, 2014) mas sem sucesso. Contudo, muito recentemente, no primeiro estudo de vigilância de vírus associados a diarreias em lémures selvagens, foi calculada uma prevalência de 25% (21/84) de animais infetados com AdVs numa comunidade existente no Parque Nacional de Ranomafana, Madagáscar (Zohdy *et al.*, 2015). A taxa de infeção foi estabelecida com base em produtos de PCR de 300 pares de bases (pb) (gene do hexão), não havendo qualquer caracterização genética das estirpes virais ou sequências depositadas nas bases de dados. No presente estudo, foi detetada a presença de AdVs em lémures de espécies distintas das descritas por Zohdy e colaboradores (2015), para além de pela primeira vez serem obtidas e analisadas sequências genómicas parciais destes AdVs. Confirmou-se, por sequenciação de DNA, a presença de AdVs em 7 animais, aparentemente saudáveis, de 3 espécies distintas dos géneros *Lemur*, *Eulemur* e *Varecia*. A ausência de doença clínica e a diversidade de sequências nucleotídicas encontrada, associadas à formação clara de um grupo monofilético distinto, apoiam a hipótese de presença de AdVs no viroma dos membros da família Lemnidae. Esta família é a única representante da subordem Strepsirrhini da ordem dos Primatas incluída na pesquisa, pelo que é a família mais distante de entre as famílias analisadas (todas as restantes da subordem Haplorrhini). A infraordem Lemniformes, onde está englobada a família Lemnidae, é endémica de Madagáscar e terá sido originada logo após a colonização da ilha por um ancestral há mais de 59 milhões de anos (Pecon-Slaterry, 2014). Ainda assim, mais uma vez, tendo em mente a teoria de coevolução vírus-hospedeiro e a maior proximidade filogenética com símios comparativamente a mamíferos não primatas, esperava-se encontrar sequências mais próximas das sequências de AdVs de hospedeiros primatas. Curiosamente, este facto não se verificou, sendo evidente a maior proximidade filogenética com sequências de AdVs de não primatas. À semelhança dos AdVs detetados

em gibões, a localização topológica destas sequências de AdVs de lémures nas duas árvores filogenéticas (Figura 3.7A, Figura 3.8A) leva a ponderar a identificação de uma nova espécie dentro do género *Mastadenovirus*, pelo que seria pertinente numa primeira fase a tentativa de obtenção da sequência nucleotídica completa do gene da DNA-Pol para posterior análise filogenética e cálculo da distância evolutiva, dando cumprimento ao critério do ICTV. O facto das sequências de AdVs dos lémures apresentarem maior proximidade filogenética com outros mamíferos não primatas, nomeadamente suínos, levou à tentativa do seu isolamento na linha celular PK15 de porco. Contrariamente ao insucesso experimentado com as linhas A549 e Vero E6, pelo menos para uma amostra observou-se replicação viral com deteção do genoma viral no sobrenadante de cultura. Este facto facilitará a sequenciação de fragmentos subgenómicos ou do próprio genoma completo e a sua caracterização. Seria igualmente importante ter acesso às sequências nucleotídicas dos AdVs detetados em lémures selvagens (Zohdy *et al.*, 2015) de modo a compará-las ou mesmo proceder à deteção de AdVs em lémures de outros parques zoológicos existentes em Portugal.

Ainda, do ponto de vista de conservação de espécies, todas as espécies da família dos gibões estão assinaladas como estando em perigo, cujo grau de gravidade varia entre vulnerável e criticamente ameaçada, enquanto 80% das espécies da família Lemnidae se encontram ameaçadas. A estas juntam-se ainda os orangotangos (género *Pongo*), sendo as duas espécies existentes consideradas ameaçada e criticamente ameaçada (IUCN, 2015). As doenças infecciosas são um dos fatores que regulam as populações de primatas. As infeções menos graves são as mais comuns e podem influenciar negativamente o estado de nutrição, alimentação, locomoção do animal, bem como dificultar a fuga de predadores e a competição por recursos ou pares de acasalamento (Gillespie *et al.*, 2008). Assim, a identificação de agentes infecciosos poderá de alguma forma contribuir para a criação de estratégias de prevenção ou deteção precoce de potenciais agentes patogénicos para estes primatas.

Nos últimos anos, um dos focos de investigação na área dos AdVs tem sido o desenvolvimento de novos vetores para vacinação, terapia génica e oncoterapia que constituam uma alternativa aos baseados em HAdV-5, cuja eficácia é significativamente reduzida devido, *inter alia*, a imunidade pré-existente contra este vírus e a toxicidade elevada (Alonso-Padilla *et al.*, 2015). A exploração para este fim de AdVs provenientes

de grandes símios e MVM, com seroprevalências baixas nas populações humanas, é atualmente uma realidade (Abbink *et al.*, 2015; Capone *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2015; Colloca *et al.*, 2012), destacando-se as vacinas com AdVs de chimpanzé já em fase de ensaios clínicos, nomeadamente ChAdV3, ChAdV63 e estirpe Y25, com expressão de antígenos do vírus da hepatite C, *Plasmodium falciparum* e vírus da gripe, respetivamente (Antrobus *et al.*, 2014; Barnes *et al.*, 2012; O'Hara *et al.*, 2012). Neste contexto, a descoberta de novos AdVs em gibões e lémures pode revelar-se importante. Apesar da dispersão global destas duas famílias de PNH através da permanência em jardins zoológicos e outras situações de cativeiro, na vida selvagem a localização geográfica de ambas está limitada a alguns países do Sudeste Asiático e Madagáscar, respetivamente. Assim, o contato com populações humanas é restrito levando a considerar a eventual presença de anticorpos neutralizantes contra estes AdVs também limitada a populações destes locais, à semelhança do observado para AdVs de chimpanzés em populações africanas comparativamente com populações de outras regiões do mundo (Xiang *et al.*, 2006). Assim, a utilização destes AdVs em vacinas noutras regiões que requerem intervenção urgente poderá ser bem-sucedida. Sendo os gibões da superfamília Hominoidea, que também inclui o Homem e os grandes símios, os seus AdVs poderão ter propriedades semelhantes às dos AdVs humanos e dos grandes símios em termos de imunogenicidade e capacidade replicativa em linhas celulares já desenvolvidas para a produção destes vetores. Quando da inoculação de culturas celulares Vero E6 com as amostras positivas para AdVs de gibões não foi observado CPE nem detetado o genoma viral por PCR. Porém, poderão ser testadas outras linhas celulares (*e.g.* A549) ou ainda feitas passagens cegas adicionais.

A distância filogenética entre lémures e seres humanos é considerável, assim como entre os respetivos AdVs. Contudo a utilização de AdVs filogeneticamente distantes também tem sido testada, inclusivamente AdVs de outros géneros para além dos *Mastadenovirus* (Alonso-Padilla *et al.*, 2015; Bangari & Mittal, 2006; Lopez-Gordo *et al.*, 2014). Apesar de se encontrar em fases muito precoces de avaliação e serem requeridos mais estudos, a título de exemplo, têm sido obtidos resultados bastante promissores com a utilização de AdVs bovinos e suínos, com capacidade de induzir respostas imunes inatas potentes (Sharma *et al.*, 2010a, 2010b). O facto de se ter conseguido replicar em culturas celulares uma das estirpes de AdVs identificada em

lémure-preto-e-branco-de-colar poderá permitir a caracterização do seu genoma completo, obtenção de vírus em quantidade que permita o estudo das suas propriedades biológicas e ainda proceder a eventual vetorização.

Concluindo, este trabalho revelou:

- Detecção presuntiva de AdVs em 82,8% (106/128) das amostras fecais provenientes de 34 espécies de primatas não humanos, assintomáticos, do Jardim Zoológico de Lisboa;
- Detecção presuntiva de AdVs em todas as espécies de hospedeiros avaliadas;
- Grupo de macacos do Novo Mundo com taxa de detecção mais baixa (67,5%), seguido de macacos do Velho Mundo (85,4%), grandes símios (88,2%), gibões (100%) e lémures (100%);
- Replicação de AdVs em culturas celulares inoculadas com amostras provenientes de gorila-ocidental-das-terras-baixas, orangotango-de-Samatra, chimpanzé-comum, macaco-do-Japão e lémure-preto-e-branco-de-colar;
- Obtenção de 24 sequências nucleotídicas distintas de AdVs para o gene do hexão e 13 para o gene da DNA-Pol;
- Elevada diversidade genética de AdVs, com distribuição por espécies humanas e símias, e obtenção de sequências altamente divergentes das existentes nas bases de dados;
- Classificação preliminar dos AdVs de amostras fecais de grandes símios nas espécies HAdV-B, -C e -E, enquanto os de macacos do Velho Mundo surgem incluídos nas espécies HAdV-G e SAdV-E (candidata);
- Um evento raro de recombinação interespecífica em AdVs de chimpanzé-comum (espécies HAdV-B e -E);
- Presença de potenciais eventos de recombinação intraspecífica (espécie HAdV-B) em AdVs de gorila-ocidental-das-terras-baixas e de recombinação interespecífica (espécies HAdV-B e -C) em AdVs de chimpanzé-comum;
- Primeira detecção e determinação de sequências nucleotídicas de AdVs em langures-de-Java e gibões;
- Obtenção pela primeira vez de sequências nucleotídicas de AdVs de orangotangos e lémures;

- Detecção de um potencial novo tipo de AdVs em macacos do Novo Mundo;
- Quatro potencias novas espécies de mastadenovírus detetadas em lémures, gibões, orangotangos e colobos.

Considerando que algumas sequências codificadoras da DNA-Pol e do hexão, pelo seu tamanho reduzido e/ou grau de divergência, não possibilitaram a inclusão preliminar nas espécies de AdVs de primatas, oficialmente estabelecidas ou candidatas, e a determinação do tipo, urge obter e analisar a sequência completa do gene da DNA-Pol, um dos critérios usados na demarcação de espécies pelo ICTV (Harrach *et al.*, 2011), especialmente no caso dos AdVs identificados em lémures e gibões. Para além disso, outras regiões codificadoras relevantes, como por exemplo as das proteínas estruturais da fibra e do pentão, têm sido utilizadas na caracterização de AdVs. Para além de incluir o determinante antigénico alvo do ensaio de inibição de hemaglutinação (Berk, 2013; Echavarría, 2015; Russell, 2009), o número de genes da fibra presente (um ou dois) tem sido assinalado como aspeto diferenciador de AdVs de primatas (Kovács *et al.*, 2005; Malouli *et al.*, 2014; Pantó *et al.*, 2015). Por outro lado, a seleção de uma região hipervariável do pentão já demonstrou utilidade na deteção de variantes genómicas distintas (Malouli *et al.*, 2014; Pantó *et al.*, 2015). Alguns autores consideram estas proteínas tão relevantes que, conjuntamente com o hexão, sugerem que a identificação da fibra esteja presente na nomenclatura dos AdVs recombinantes (Aoki *et al.*, 2011). Contudo, tal como referido ao longo da discussão, no caso dos potenciais vírus recombinantes, o ideal será sequenciar segmentos subgenómicos de grandes dimensões (*e.g.* entre o gene da DNA-Pol e do hexão) ou genomas completos. Ainda, atendendo a que houve necessidade de restringir a análise a um subgrupo de amostras positivas por PCR, para as restantes não foi confirmada a presença de AdVs nem analisadas as suas sequências, pelo que este trabalho deverá ser completado. Igualmente, no caso das amostras cujos clones sequenciados não deram origem a sequências de AdVs, outros clones deverão ser sequenciados.

Num contexto de avaliação de possíveis transmissões interespecíficas, seria interessante a pesquisa de AdVs em amostras fecais de tratadores dos PNH identificados como hospedeiros, permitindo a comparação dos AdVs excretados por ambos. Outra opção seria a análise serológica (*e.g.* seroneutralização, no caso de vírus isolados em

culturas celulares) dos tratadores relativamente à presença de anticorpos contra os AdVs detetados nos PNH. Na mesma perspetiva, poder-se-ia fazer o rastreio de AdVs em amostras fecais de outros animais alojados nas proximidades ou, ainda, em roedores que circulem no mesmo espaço.

5. Referências Bibliográficas

5. Referências Bibliográficas

- Abbink, P., Maxfield, L.F., Ng'ang'a, D., Borducchi, E.N., Iampietro, M.J., Bricault, C.A., Teigler, J.E., Blackmore, S., Parenteau, L., Wagh, K., Handley, S.A., Zhao, G., Virgin, H.W., Korber, B. & Barouch, D.H. (2015). Construction and evaluation of novel rhesus monkey adenovirus vaccine vectors. *Journal of Virology*. 89 (3). p. 1512–1522.
- Ahi, Y.S., Vemula, S. V & Mittal, S.K. (2013). Adenoviral E2 IVa2 protein interacts with L4 33K protein and E2 DNA-binding protein. *Journal of General Virology*. 94. p. 1325–1334.
- Alonso-Padilla, J., Papp, T., Kaján, G.L., Benkő, M., Havenga, M., Lemckert, A., Harrach, B. & Baker, A.H. (2015). Development of novel adenoviral vectors to overcome challenges observed with HAdV-5–based constructs. *Molecular Therapy*. VI (2). p. 36–61.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215 (3). p. 403–410.
- Antrobus, R., Coughlan, L., Berthoud, T.K., Dicks, M.D., Hill, A.V., Lambe, T. & Gilbert, S.C. (2014). Clinical assessment of a novel recombinant simian adenovirus ChAdOx1 as a vectored vaccine expressing conserved Influenza A antigens. *Molecular Therapy*. 22 (3). p. 668–674.
- Aoki, K., Benkő, M., Davison, A.J., Echavarria, M., Erdman, D.D., Harrach, B., Kajon, A.E., Schnurr, D. & Wadell, G. (2011). Toward an integrated human adenovirus designation system that utilizes molecular and serological data and serves both clinical and fundamental virology. *Journal of Virology*. 85 (11). p. 5703–5704.
- Bangari, D.S. & Mittal, S.K. (2006). Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. *Vaccine*. 24 (7). p. 849–862.
- Bányai, K., Esona, M.D., Liu, A., Wang, Y., Tu, X. & Jiang, B. (2010). Molecular detection of novel adenoviruses in fecal specimens of captive monkeys with diarrhea in China. *Veterinary Microbiology*. 142 (3-4). p. 416–419.
- Barnes, E., Folgori, A., Capone, S., Swadling, L., Aston, S., Kurioka, A., Meyer, J., Huddart, R., Smith, K., Townsend, R., Brown, A., Antrobus, R., Ammendola, V., Naddeo, M., O'Hara, G., Willberg, C., Harrison, A., Grazioli, F., Esposito, M.L., Siani, L., Traboni, C., Oo, Y., Adams, D., Hill, A., Colloca, S., Nicosia, A., Cortese, R. & Klennerman, P. (2012). Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in Man. *Science Translational Medicine*. 4 (115). p. 115ra1.
- Barouch, D.H. (2010). Novel adenovirus vector-based vaccines for HIV-1. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 5 (5). p. 386–390.
- Benkő, M. & Harrach, B. (2003). Molecular evolution of adenoviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 272. p. 3–35.
- Berget, S.M., Moore, C. & Sharp, P.A. (1977). A spliced sequence at the 5'-terminus of adenovirus late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 74

- (8). p. 3171–3175.
- Berk, A.J. (2013). Adenoviridae. Em: D. M. Knipe & P. M. Howley (eds.). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, p. 1704–1731.
- Campos, S.K. & Barry, M.A. (2007). Current advances and future challenges in adenoviral vector biology and targeting. *Current Gene Therapy*. 7 (3). p. 189–204.
- Capone, S., D’Alise, A.M., Ammendola, V., Colloca, S., Cortese, R., Nicosia, A. & Folgori, A. (2013). Development of chimpanzee adenoviruses as vaccine vectors: challenges and successes emerging from clinical trials. *Expert Review of Vaccines*. 12 (4). p. 379–393.
- Chen, E.C., Yagi, S., Kelly, K.R., Mendoza, S.P., Maninger, N., Rosenthal, A., Spinner, A., Bales, K.L., Schnurr, D.P., Lerche, N.W. & Chiu, C.Y. (2011). Cross-species transmission of a novel adenovirus associated with a fulminant pneumonia outbreak in a New World monkey colony. *PLoS Pathogens*. 7 (7). p. e1002155.
- Cheng, C., Wang, L., Ko, S.-Y., Kong, W.-P., Schmidt, S.D., Gall, J.G.D., Colloca, S., Seder, R.A., Mascola, J.R. & Nabel, G.J. (2015). Combination recombinant simian or chimpanzee adenoviral vectors for vaccine development. *Vaccine*. 33 (51). p. 7344–7351.
- Chiu, C.Y., Yagi, S., Lu, X., Yu, G., Chen, E.C., Liu, M., Dick, E.J., Carey, K.D., Erdman, D.D., Leland, M.M. & Patterson, J.L. (2013). A novel adenovirus species associated with an acute respiratory outbreak in a baboon colony and evidence of coincident human infection. *mBio*. 4 (2). p. e00084–13.
- Colloca, S., Barnes, E., Folgori, A., Ammendola, V., Capone, S., Cirillo, A., Siani, L., Naddeo, M., Grazioli, F., Esposito, M.L., Ambrosio, M., Sparacino, A., Bartiromo, M., Meola, A., Smith, K., Kurioka, A., O’Hara, G.A., Ewer, K.J., Anagnostou, N., Bliss, C., Hill, A.V.S., Traboni, C., Klennerman, P., Cortese, R. & Nicosia, A. (2012). Generation and screening of a large collection of novel simian adenovirus allows the identification of vaccine vectors inducing potent cellular immunity in humans. *Science Translational Medicine*. 4 (115). p. 115ra2.
- Davies, T.J. & Pedersen, A.B. (2008). Phylogeny and geography predict pathogen community similarity in wild primates and humans. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 275 (1643). p. 1695–1701.
- Davison, A.J., Benko, M. & Harrach, B. (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *Journal of General Virology*. 84. p. 2895–2908.
- Dehghan, S., Seto, J., Jones, M.S., Dyer, D.W., Chodosh, J. & Seto, D. (2013a). Simian adenovirus type 35 has a recombinant genome comprising human and simian adenovirus sequences, which predicts its potential emergence as a human respiratory pathogen. *Virology*. 447 (1-2). p. 265–273.
- Dehghan, S., Seto, J., Liu, E.B., Walsh, M.P., Dyer, D.W., Chodosh, J. & Seto, D. (2013b). Computational analysis of four human adenovirus type 4 genomes reveals molecular evolution through two interspecies recombination events. *Virology*. 443 (2). p. 197–207.
- Dicks, M.D.J., Spencer, A.J., Edwards, N.J., Wadell, G., Bojang, K., Gilbert, S.C., Hill,

- A.V.S. & Cottingham, M.G. (2012). A novel chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: improved systems for vector derivation and comparative immunogenicity. *PLoS ONE*. 7 (7). p. e40385.
- Doszpoly, A., Wellehan Jr, J.F.X., Childress, A.L., Tarján, Z.L., Kovács, E.R., Harrach, B. & Benko, M. (2013). Partial characterization of a new adenovirus lineage discovered in testudinoid turtles. *Infection, Genetics and Evolution*. 17. p. 106–112.
- Ebner, K., Pinsker, W. & Lion, T. (2005). Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications. *Journal of Virology*. 79 (20). p. 12635–12642.
- Echavarría, M. (2015). Adenoviruses. Em: *eLS*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p. 1–14.
- Edelstein, M. (2015). *Gene therapy clinical trials worldwide*. [Online]. 2015. The Journal of Gene Medicine. Disponível em: <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>. [Acedido: 11 Agosto 2015].
- Enders, J.F., Bell, J.A., Dingle, J.H., Francis, T., Hilleman, M.R., Huebner, R.J. & Payne, A.M.-M. (1956). «Adenoviruses»: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science*. 124 (3212). p. 119–120.
- Ersching, J., Hernandez, M.I.M., Cezarotto, F.S., Ferreira, J.D.S., Martins, A.B., Switzer, W.M., Xiang, Z., Ertl, H.C.J., Zanetti, C.R. & Pinto, A.R. (2010). Neutralizing antibodies to human and simian adenoviruses in humans and New-World monkeys. *Virology*. 407 (1). p. 1–6.
- Fay, N. & Panté, N. (2015). Old foes, new understandings: nuclear entry of small non-enveloped DNA viruses. *Current Opinion in Virology*. 12. p. 59–65.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39 (4). p. 783–791.
- Foytich, K.R., Deshazer, G., Esona, M.D., Liu, A., Wang, Y., Tu, X. & Jiang, B. (2014). Identification of new provisional simian adenovirus species from captive monkeys, China. *Emerging Infectious Diseases*. 20 (10). p. 1758–1759.
- Gál, J., Hornyák, Á., Mándoki, M., Bakonyi, T., Balka, G., Szeredi, L., Marosán, M., Ludányi, T., Forgách, P., Sós, E., Demeter, Z. & Farkas, S.L. (2013). Novel mastadenovirus infection and clinical disease in a pygmy marmoset (*Callithrix [Cebuella] pygmaea*). *Veterinary Microbiology*. 167 (3-4). p. 695–699.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., Sharp, P.M. & Hahn, B.H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*. 397. p. 436–441.
- Geissmann, T. (2014). *Gibbon distribution*. [Online]. 2014. Gibbon Systematics and Species Identification. Disponível em: <http://www.gibbons.de/main/index.html>. [Acedido: 13 Outubro 2015].
- Gillespie, T.R., Nunn, C.L. & Leendertz, F.H. (2008). Integrative approaches to the study of primate infectious disease: implications for biodiversity conservation and global health. *American Journal of Physical Anthropology*. 137 (S47). p. 53–69.

- Graziano, V., Luo, G., Blainey, P.C., Perez-Berna, A.J., McGrath, W.J., Flint, S.J., San Martin, C., Xie, X.S. & Mangel, W.F. (2013). Regulation of a viral proteinase by a peptide and DNA in one-dimensional space: II. Adenovirus proteinase is activated in an unusual one-dimensional biochemical reaction. *The Journal of Biological Chemistry*. 288 (3). p. 2068–2080.
- Hall, N.H., Archer, L.L., Childress, A.L. & Wellehan Jr, J.F.X. (2012). Identification of a novel adenovirus in a cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 24 (2). p. 359–363.
- Hall, R.J., Wang, J., Todd, A.K., Bissielo, A.B., Yen, S., Strydom, H., Moore, N.E., Ren, X., Huang, Q.S., Carter, P.E. & Peacey, M. (2014). Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery. *Journal of Virological Methods*. 195. p. 194–204.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41. p. 95–98.
- Harrach, B. (2014). Adenoviruses: general features. Em: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier.
- Harrach, B., Benkö, M., Both, G.W., Brown, M., Davison, A.J., Echavarria, M., Hess, M., Jones, M.S., Kajon, A., Lehmkuhl, H.D., Mautner, V., Mittal, S.K. & Wadell, G. (2011). Adenoviridae. Em: A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, & E. J. Lefkowitz (eds.). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, USA: Elsevier Inc., p. 125–141.
- Hilleman, M.R. & Werner, J.H. (1954). Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 85 (1). p. 183–188.
- Hoeben, R.C. & Uil, T.G. (2013). Adenovirus DNA replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 5. p. a013003.
- Hoffert, W.R., Bates, M.E. & Cheever, F.S. (1958). Study of enteric viruses of simian origin. *American Journal of Hygiene*. 68 (1). p. 15–30.
- Hoppe, E., Pauly, M., Gillespie, T.R., Akoua-Koffi, C., Hohmann, G., Fruth, B., Karhemere, S., Madinda, N.F., Mugisha, L., Muyembe, J.-J., Todd, A., Petrzalkova, K.J., Gray, M., Robbins, M., Bergl, R.A., Wittig, R.M., Zuberbuhler, K., Boesch, C., Schubert, G., Leendertz, F.H., Ehlers, B. & Calvignac-Spencer, S. (2015a). Multiple cross-species transmission events of human adenoviruses (HAdV) during Hominine evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 32 (8). p. 2072–2084.
- Hoppe, E., Pauly, M., Robbins, M., Gray, M., Kujirakwinja, D., Nishuli, R., Mungu-Akonkwa, D.B., Leendertz, F.H. & Ehlers, B. (2015b). Phylogenomic evidence for recombination of adenoviruses in wild gorillas. *Journal of General Virology*. 96 (10). p. 3090–3098.
- Horwitz, M.S. (2004). Function of adenovirus E3 proteins and their interactions with immunoregulatory cell proteins. *The Journal of Gene Medicine*. 6 (S1). p. S172–S183.

- Hosseini, S.Y., Sabahi, F., Moazzeni, S.M., Modarressi, M.H., Firoozi, M.S. & Ravanshad, M. (2012). Construction and preparation of three recombinant adenoviruses expressing truncated NS3 and core genes of hepatitis C virus for vaccine purposes. *Hepatitis Monthly*. 12 (8). p. e6130.
- Hull, R.N., Minner, J.R. & Mascoli, C.C. (1958). New viral agents recovered from tissue cultures of monkey kidney cells. III. Recovery of additional agents both from cultures of monkey tissues and directly from tissues and excreta. *American Journal of Hygiene*. 68 (1). p. 31–44.
- Hull, R.N., Minner, J.R. & Smith, J.W. (1956). New viral agents recovered from tissue cultures of monkey kidney cells. I. Origin and properties of cytopathogenic agents S.V.1, S.V.2, S.V.4, S.V.5, S.V.6, S.V.11, S.V.12 and S.V.15. *American Journal of Hygiene*. 63 (2). p. 204–215.
- IUCN (2015). *The IUCN red list of threatened species. Version 2015-4*. [Online]. 2015. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. [Acedido: 13 Outubro 2015].
- Jones II, M.S., Harrach, B., Ganac, R.D., Gozum, M.M.A., Dela Cruz, W.P., Riedel, B., Pan, C., Delwart, E.L. & Schnurr, D.P. (2007). New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *Journal of Virology*. 81 (11). p. 5978–5984.
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L. & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 451 (7181). p. 990–993.
- Kälin, S., Amstutz, B., Gastaldelli, M., Wolfrum, N., Boucke, K., Havenga, M., DiGennaro, F., Liska, N., Hemmi, S. & Greber, U.F. (2010). Macropinocytotic uptake and infection of human epithelial cells with species B2 adenovirus type 35. *Journal of Virology*. 84 (10). p. 5336–5350.
- Katoh, K. & Standley, D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*. 30 (4). p. 772–780.
- Kaur, T., Singh, J., Tong, S., Humphrey, C., Clevenger, D., Tan, W., Szekely, B., Wang, Y., Li, Y., Alex Muse, E., Kiyono, M., Hanamura, S., Inoue, E., Nakamura, M., Huffman, M.A., Jiang, B. & Nishida, T. (2008). Descriptive epidemiology of fatal respiratory outbreaks and detection of a human-related metapneumovirus in wild chimpanzees (*Pan troglodytes*) at Mahale Mountains National Park, Western Tanzania. *American Journal of Primatology*. 70 (8). p. 755–765.
- Keele, B.F., Jones, J.H., Terio, K.A., Estes, J.D., Rudicell, R.S., Wilson, M.L., Li, Y., Learn, G.H., Beasley, T.M., Schumacher-Stankey, J., Wroblewski, E., Mosser, A., Raphael, J., Kamenya, S., Lonsdorf, E. V, Travis, D. a, Mlengya, T., Kinsel, M.J., Else, J.G., Silvestri, G., Goodall, J., Sharp, P.M., Shaw, G.M., Pusey, A.E. & Hahn, B.H. (2009). Increased mortality and AIDS-like immunopathology in wild chimpanzees infected with SIVcpz. *Nature*. 460 (7254). p. 515–519.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16 (2). p. 111–120.
- King, A.J. & van der Vliet, P.C. (1994). A precursor terminal protein-trinucleotide

- intermediate during initiation of adenovirus DNA replication: regeneration of molecular ends in vitro by a jumping back mechanism. *The EMBO Journal*. 13 (23). p. 5786–5792.
- Kingdon, J. & Butynski, T.M. (2008). *Chlorocebus aethiops*. [Online]. 2008. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T4233A10695029. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T4233A10695029.en>. [Acedido: 29 Outubro 2015].
- Köndgen, S., Köhl, H., N’Goran, P.K., Walsh, P.D., Schenk, S., Ernst, N., Biek, R., Formenty, P., Mätz-Rensing, K., Schweiger, B., Junglen, S., Ellerbrok, H., Nitsche, A., Briesse, T., Lipkin, W.I., Pauli, G., Boesch, C. & Leendertz, F.H. (2008). Pandemic human viruses cause decline of endangered great apes. *Current Biology*. 18 (4). p. 260–264.
- Kovács, G., Harrach, B., Zakhartchouk, A.N. & Davison, A.J. (2005). Complete genome sequence of simian adenovirus 1: an Old World monkey adenovirus with two fiber genes. *Journal of General Virology*. 86 (6). p. 1681–1686.
- Lion, T. (2014). Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*. 27 (3). p. 441–462.
- Lole, K.S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gadkari, D., Kulkarni, S.S., Novak, N.G., Ingersoll, R., Sheppard, H.W. & Ray, S.C. (1999). Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *Journal of Virology*. 73 (1). p. 152–160.
- Lopez-Gordo, E., Podgorski, I.I., Downes, N. & Alemany, R. (2014). Circumventing antivector immunity: potential use of nonhuman adenoviral vectors. *Human Gene Therapy*. 25 (4). p. 285–300.
- Lu, J., Wang, Q., Wang, H., Li, G. & Gao, G. (2011). Molecular characterization of adenoviruses in fecal samples of captive bred rhesus macaques in China. *Veterinary Microbiology*. 149 (3-4). p. 461–466.
- Lukashev, A.N., Ivanova, O.E., Ereemeeva, T.P. & Iggo, R.D. (2008). Evidence of frequent recombination among human adenoviruses. *Journal of General Virology*. 89 (2). p. 380–388.
- Madisch, I., Harste, G., Pommer, H. & Heim, A. (2005). Phylogenetic analysis of the main neutralization and hemagglutination determinants of all human adenovirus prototypes as a basis for molecular classification and taxonomy. *Journal of Virology*. 79 (24). p. 15265–15276.
- Malouli, D., Howell, G.L., Legasse, A.W., Kahl, C., Axthelm, M.K., Hansen, S.G. & Früh, K. (2014). Full genome sequence analysis of a novel adenovirus of rhesus macaque origin indicates a new simian adenovirus type and species. *Virology Reports*. 3-4. p. 18–29.
- Maluquer de Motes, C., Hundesa, A., Almeida, F.C., Bofill-Mas, S. & Girones, R. (2011). Isolation of a novel monkey adenovirus reveals a new phylogenetic clade in the evolutionary history of simian adenoviruses. *Virology Journal*. 8 (125).

- Mast, T.C., Kierstead, L., Gupta, S.B., Nikas, A.A., Kallas, E.G., Novitsky, V., Mbewe, B., Pitisuttithum, P., Schechter, M., Vardas, E., Wolfe, N.D., Aste-Amezaga, M., Casimiro, D.R., Coplan, P., Straus, W.L. & Shiver, J.W. (2010). International epidemiology of human pre-existing adenovirus (Ad) type-5, type-6, type-26 and type-36 neutralizing antibodies: correlates of high Ad5 titers and implications for potential HIV vaccine trials. *Vaccine*. 28 (4). p. 950–957.
- McConnell, M.J. & Imperiale, M.J. (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Human Gene Therapy*. 15 (11). p. 1022–1033.
- McElrath, M.J., De Rosa, S.C., Moodie, Z., Dubey, S., Kierstead, L., Janes, H., Defawe, O.D., Carter, D.K., Hural, J., Akondy, R., Buchbinder, S.P., Robertson, M.N., Mehrotra, D. V, Self, S.G., Corey, L., Shiver, J.W. & Casimiro, D.R. (2008). HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *The Lancet*. 372 (9653). p. 1894–1905.
- McVey, D., Cranfield, M.R., Torano, H., Kuete, H.M., Lee, G.P., Glenn, A., Bruder, J.T., Rangel, D., Brough, D.E. & Gall, J.G. (2013). Adenoviruses isolated from wild gorillas are closely related to human species C viruses. *Virology*. 444 (1-2). p. 119–123.
- Mirza, M.A. & Weber, J. (1982). Structure of adenovirus chromatin. *Biochimica et biophysica acta*. 696 (1). p. 76–86.
- Mombo, I.M., Berthet, N., Lukashev, A.N., Bleicker, T., Brünink, S., Léger, L., Atencia, R., Cox, D., Bouchier, C., Durand, P., Arnathau, C., Brazier, L., Fair, J.N., Schneider, B.S., Drexler, J.F., Prugnolle, F., Drosten, C., Renaud, F., Leroy, E.M. & Rougeron, V. (2015). First detection of an enterovirus C99 in a captive chimpanzee with acute flaccid paralysis, from the Tchimpounga Chimpanzee Rehabilitation Center, Republic of Congo. *PLoS ONE*. 10 (8). p. e0136700.
- Morris, S.J., Scott, G.E. & Leppard, K.N. (2010). Adenovirus late-phase infection is controlled by a novel L4 promoter. *Journal of Virology*. 84 (14). p. 7096–7104.
- Mossoun, A., Pauly, M., Akoua-Koffi, C., Couacy-Hymann, E., Leendertz, S.A.J., Anoh, A.E., Gnoukpoho, A.H., Leendertz, F.H. & Schubert, G. (2015). Contact to non-human primates and risk factors for zoonotic disease emergence in the Taï region, Côte d'Ivoire. *EcoHealth*. 12 (4). p. 580–591.
- Murali, V.K., Ornelles, D.A., Gooding, L.R., Wilms, H.T., Huang, W., Tollefson, A.E., Wold, W.S.M. & Garnett-Benson, C. (2014). Adenovirus death protein (ADP) is required for lytic infection of human lymphocytes. *Journal of Virology*. 88 (2). p. 903–912.
- Nemajerova, A., Talos, F., Moll, U.M. & Petrenko, O. (2008). Rb function is required for E1A-induced S-phase checkpoint activation. *Cell Death and Differentiation*. 15 (9). p. 1440–1449.
- Nemerow, G.R. & Stewart, P.L. (1999). Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63 (3). p. 725–734.
- O'Hara, G.A., Duncan, C.J.A., Ewer, K.J., Collins, K.A., Elias, S.C., Halstead, F.D., Goodman, A.L., Edwards, N.J., Reyes-Sandoval, A., Bird, P., Rowland, R., Sheehy,

- S.H., Poulton, I.D., Hutchings, C., Todryk, S., Andrews, L., Folgori, A., Berrie, E., Moyle, S., Nicosia, A., Colloca, S., Cortese, R., Siani, L., Lawrie, A.M., Gilbert, S.C. & Hill, A.V.S. (2012). Clinical assessment of a recombinant simian adenovirus ChAd63: a potent new vaccine vector. *Journal of Infectious Diseases*. 205 (5). p. 772–781.
- O'Malley, R.P., Mariano, T.M., Siekierka, J. & Mathews, M.B. (1986). A mechanism for the control of protein synthesis by adenovirus VA RNAI. *Cell*. 44 (3). p. 391–400.
- Oates, J.F., Hart, J., Groves, C.P. & Butynski, T.M. (2008). *Cercopithecus ascanius*. [Online]. 2008. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T4212A10654844. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T4212A10654844.en>. [Acedido: 29 Outubro 2015].
- Pantó, L., Podgorski, I.I., Jánoska, M., Márkó, O. & Harrach, B. (2015). Taxonomy proposal for Old World monkey adenoviruses: characterisation of several non-human, non-ape primate adenovirus lineages. *Archives of Virology*. 160 (12). p. 3165–3177.
- Pauly, M., Akoua-Koffi, C., Buchwald, N., Schubert, G., Weiss, S., Couacy-Hymann, E., Anoh, A.E., Mossoun, A., Calvignac-Spencer, S., Leendertz, S.A., Leendertz, F.H. & Ehlers, B. (2015). Adenovirus in rural Côte D'Ivoire: high diversity and cross-species detection. *EcoHealth*. 12 (3). p. 441–452.
- Pecon-Slaterry, J. (2014). Recent advances in primate phylogenomics. *Annual Review of Animal Biosciences*. 2. p. 41–63.
- Pedersen, A.B. & Davies, T.J. (2009). Cross-species pathogen transmission and disease emergence in primates. *EcoHealth*. 6 (4). p. 496–508.
- Pérez-Berná, A.J., Mangel, W.F., McGrath, W.J., Graziano, V., Flint, J. & San Martín, C. (2014). Processing of the L1 52/55k protein by the adenovirus protease: a new substrate and new insights into virion maturation. *Journal of Virology*. 88 (3). p. 1513–1524.
- Podgorski, I. & Harrach, B. (2015). 2 new species in the genus *Mastadenovirus*. [Online]. 2015. ICTV Talk and Discussions. Disponível em: http://talk.ictvonline.org/files/proposals/animal_dna_viruses_and_retroviruses/m/animal_dna_newly_submitted/5401.aspx. [Acedido: 21 Setembro 2015].
- Priddy, F.H., Brown, D., Kublin, J., Monahan, K., Wright, D.P., Lalezari, J., Santiago, S., Marmor, M., Lally, M., Novak, R.M., Brown, S.J., Kulkarni, P., Dubey, S. a, Kierstead, L.S., Casimiro, D.R., Mogg, R., DiNubile, M.J., Shiver, J.W., Leavitt, R.Y., Robertson, M.N., Mehrotra, D. V & Quirk, E. (2008). Safety and immunogenicity of a replication-incompetent adenovirus type 5 HIV-1 clade B gag/pol/nef vaccine in healthy adults. *Clinical Infectious Diseases*. 46 (11). p. 1769–1781.
- Reddy, V.S. & Nemerow, G.R. (2014). Structures and organization of adenovirus cement proteins provide insights into the role of capsid maturation in virus entry and infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111 (32). p. 11715–11720.

- Robinson, C.M., Singh, G., Lee, J.Y., Dehghan, S., Rajaiya, J., Liu, E.B., Yousuf, M.A., Betensky, R.A., Jones, M.S., Dyer, D.W., Seto, D. & Chodosh, J. (2013). Molecular evolution of human adenoviruses. *Scientific Reports*. 3 (1812). p. 1–7.
- Roelvink, P.W., Lizonova, A., Lee, J.G., Li, Y., Bergelson, J.M., Finberg, R.W., Brough, D.E., Kovesdi, I. & Wickham, T.J. (1998). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *Journal of Virology*. 72 (10). p. 7909–7915.
- Rowe, W.P., Hartley, J.W. & Huebner, R.J. (1956). Additional serotypes of the APC virus group. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 91 (2). p. 260–262.
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H. & Ward, T.G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 84 (3). p. 570–573.
- Roy, S., Calcedo, R., Medina-Jaszek, A., Keough, M., Peng, H. & Wilson, J.M. (2011). Adenoviruses in lymphocytes of the human gastro-intestinal tract. *PLoS ONE*. 6 (9). p. e24859.
- Roy, S., Sandhu, A., Medina, A., Clawson, D.S. & Wilson, J.M. (2012). Adenoviruses in fecal samples from asymptomatic rhesus macaques, United States. *Emerging Infectious Diseases*. 18 (7). p. 1081–1088.
- Roy, S., Vandenberghe, L.H., Kryazhimskiy, S., Grant, R., Calcedo, R., Yuan, X., Keough, M., Sandhu, A., Wang, Q., Medina-Jaszek, C.A., Plotkin, J.B. & Wilson, J.M. (2009). Isolation and characterization of adenoviruses persistently shed from the gastrointestinal tract of non-human primates. *PLoS Pathogens*. 5 (7). p. e1000503.
- Russell, W.C. (2009). Adenoviruses: update on structure and function. *Journal of General Virology*. 90 (1). p. 1–20.
- Ryan, S.J. & Walsh, P.D. (2011). Consequences of non-intervention for infectious disease in african great apes. *PLoS ONE*. 6 (12). p. e29030.
- Saha, B., Wong, C. & Parks, R. (2014). The adenovirus genome contributes to the structural stability of the virion. *Viruses*. 6 (9). p. 3563–3583.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4 (4). p. 406–425.
- San Martín, C. (2012). Latest insights on adenovirus structure and assembly. *Viruses*. 4 (5). p. 847–877.
- Sander, D. (2007). *Adenoviridae*. [Online]. 2007. The Big Picture Book of Viruses. Disponível em: http://www.virology.net/Big_Virology/BVDNAadeno.html. [Acedido: 14 Setembro 2015].
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74 (12). p. 5463–5467.

- Schuldt, N.J. & Amalfitano, A. (2012). Malaria vaccines: focus on adenovirus based vectors. *Vaccine*. 30 (35). p. 5191–5198.
- Seimon, T.A., Olson, S.H., Lee, K.J., Rosen, G., Ondzie, A., Cameron, K., Reed, P., Anthony, S.J., Joly, D.O., McAloose, D. & Lipkin, W.I. (2015). Adenovirus and herpesvirus diversity in free-ranging great apes in the Sangha region of the Republic of Congo. *PLoS ONE*. 10 (3). p. e0118543.
- Seto, D., Chodosh, J., Brister, J.R. & Jones, M.S. (2011). Using the whole-genome sequence to characterize and name human adenoviruses. *Journal of Virology*. 85 (11). p. 5701–5702.
- Sharma, A., Bangari, D.S., Tandon, M., Hogenesch, H. & Mittal, S.K. (2010a). Evaluation of innate immunity and vector toxicity following inoculation of bovine, porcine or human adenoviral vectors in a mouse model. *Virus Research*. 153 (1). p. 134–142.
- Sharma, A., Li, X., Bangari, D.S. & Mittal, S.K. (2009). Adenovirus receptors and their implications in gene delivery. *Virus Research*. 143 (2). p. 184–194.
- Sharma, A., Tandon, M., Ahi, Y.S., Bangari, D.S., Vemulapalli, R. & Mittal, S.K. (2010b). Evaluation of cross-reactive cell-mediated immune responses among human, bovine and porcine adenoviruses. *Gene Therapy*. 17 (5). p. 634–642.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D. & Higgins, D.G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*. 7 (539).
- Smaill, F., Jeyanathan, M., Smieja, M., Medina, M.F., Thantrige-Don, N., Zganiacz, A., Yin, C., Heriazon, A., Damjanovic, D., Puri, L., Hamid, J., Xie, F., Foley, R., Bramson, J., Gauldie, J. & Xing, Z. (2013). A human type 5 adenovirus-based tuberculosis vaccine induces robust T cell responses in humans despite preexisting anti-adenovirus immunity. *Science Translational Medicine*. 5 (205). p. 205ra134.
- Stewart, P.L., Chiu, C.Y., Huang, S., Muir, T., Zhao, Y., Chait, B., Mathias, P. & Nemerow, G.R. (1997). Cryo-EM visualization of an exposed RGD epitope on adenovirus that escapes antibody neutralization. *The EMBO Journal*. 16 (6). p. 1189–1198.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30 (12). p. 2725–2729.
- Tong, S., Singh, J., Ruone, S., Humphrey, C., Yip, C.C.Y., Lau, S.K.P., Anderson, L.J. & Kaur, T. (2010). Identification of adenoviruses in fecal specimens from wild chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Western Tanzania. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 82 (5). p. 967–970.
- Trentin, J.J., Yabe, Y. & Taylor, G. (1962). The quest for human cancer viruses. *Science*. 137 (3533). p. 835–841.
- Wevers, D., Leendertz, F.H., Scuda, N., Boesch, C., Robbins, M.M., Head, J., Ludwig, C., Kühn, J. & Ehlers, B. (2010). A novel adenovirus of western lowland gorillas

- (Gorilla gorilla gorilla). *Virology Journal*. 7 (1). p. 303.
- Wevers, D., Metzger, S., Babweteera, F., Bieberbach, M., Boesch, C., Cameron, K., Couacy-Hymann, E., Cranfield, M., Gray, M., Harris, L.A., Head, J., Jeffery, K., Knauf, S., Lankester, F., Leendertz, S.A.J., Lonsdorf, E., Mugisha, L., Nitsche, A., Reed, P., Robbins, M., Travis, D.A., Zommers, Z., Leendertz, F.H. & Ehlers, B. (2011). Novel adenoviruses in wild primates: a high level of genetic diversity and evidence of zoonotic transmissions. *Journal of Virology*. 85 (20). p. 10774–10784.
- Wiethoff, C.M. & Nemerow, G.R. (2015). Adenovirus membrane penetration: tickling the tail of a sleeping dragon. *Virology*. 479-480. p. 591–599.
- Wold, W.S.M. & Ison, M.G. (2013). Adenoviruses. Em: D. M. Knipe & P. M. Howley (eds.). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, p. 1732–1767.
- Wold, W.S.M. & Toth, K. (2013). Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Current Gene Therapy*. 13 (6). p. 421–433.
- Wolfe, N.D., Dunavan, C.P. & Diamond, J. (2007). Origins of major human infectious diseases. *Nature*. 447 (7142). p. 279–283.
- Xi, Q., Cuesta, R. & Schneider, R.J. (2005). Regulation of translation by ribosome shunting through phosphotyrosine-dependent coupling of adenovirus protein 100k to viral mRNAs. *Journal of Virology*. 79 (9). p. 5676–5683.
- Xiang, K., Ying, G., Yan, Z., Shanshan, Y., Lei, Z., Hongjun, L. & Maosheng, S. (2015). Progress on adenovirus-vectored universal influenza vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 11 (5). p. 1209–1222.
- Xiang, Z., Li, Y., Cun, A., Yang, W., Ellenberg, S., Switzer, W.M., Kalish, M.L. & Ertl, H.C.J. (2006). Chimpanzee adenovirus antibodies in humans, sub-Saharan Africa. *Emerging Infectious Diseases*. 12 (10). p. 1596–1599.
- Yu, G., Yagi, S., Carrion Jr, R., Chen, E.C., Liu, M., Brasky, K.M., Lanford, R.E., Kelly, K.R., Bales, K.L., Schnurr, D.P., Canfield, D.R., Patterson, J.L. & Chiu, C.Y. (2013). Experimental cross-species infection of common marmosets by titi monkey adenovirus. *PLoS ONE*. 8 (7). p. e68558.
- Zhang, W. & Imperiale, M.J. (2000). Interaction of the adenovirus IVa2 protein with viral packaging sequences. *Journal of Virology*. 74 (6). p. 2687–2693.
- Zhou, C., Tian, H., Wang, X., Liu, W., Yang, S., Shen, Q., Wang, Y., Ni, B., Chen, S., Fu, X., Fei, R. & Zhang, W. (2014). The genome sequence of a novel simian adenovirus in a chimpanzee reveals a close relationship to human adenoviruses. *Archives of Virology*. 159 (7). p. 1765–1770.
- Zohdy, S., Grossman, M.K., Fried, I.R., Rasambainarivo, F.T., Wright, P.C. & Gillespie, T.R. (2015). Diversity and prevalence of diarrhea-associated viruses in the lemur community and associated human population of Ranomafana National Park, Madagascar. *International Journal of Primatology*. 36 (1). p. 143–153.

6. Anexos

Anexo 1

Tabela de códigos de ambiguidade da IUPAC para nucleótidos.

Símbolo	Descrição	Nucleótidos
A	Adenina	A
C	Citosina	C
G	Guanina	G
T	Timidina	T
K	Com grupos ceto (<i>keto</i>) em posição comum	G ou T
M	Com grupos amino em posição comum	A ou C
S	Ligação de hidrogénio forte (<i>strong</i>)	C ou G
W	Ligação de hidrogénio fraca (<i>weak</i>)	A ou T
R	Purina	A ou G
Y	Pirimidina (<i>Pyrimidine</i>)	C ou T
B	não A	C ou G ou T
D	não C	A ou G ou T
H	não G	A ou C ou T
V	não T	A ou C ou G
N	Qualquer nucleótido (<i>any</i>)	A ou C ou G ou T

Anexo 2

Composição de meios de cultura e soluções utilizados.

Meio/Solução	Componentes
Meio de cultura LB (Luria-Bertani)	10 g Bacto-triptona 5 g extrato de levedura 10 g NaCl 15 g agar* Adicionar água para 1000 ml e autoclavar * Não adicionar para meio líquido
Solução de agarose a 1,2% (100 ml)	1,2 g agarose 100 ml TAE 0,5X
Solução de agarose a 1% (100 ml)	1,0 g agarose 100 ml TAE 0,5X
Tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 50X	242 g Tris-base 57,1 ml ácido acético glacial 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 Adicionar água para 1000 ml
Solução de transformação e armazenamento (TSS)	LB 1X 10% (v/v) PEG6000 5% (v/v) DMSO 50 mM MgSO ₄ (pH 6,5)
Solução Tris-EDTA-Glucose (TEG)	50 mM glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
Solução de lise	0,2 M NaOH 1,5% (p/v) SDS
Solução Tris-EDTA (TE)	10 mM Tris 1 mM EDTA (pH 8,0)

Anexo 3

Dados relativos aos primatas não humanos incluídos no estudo, com identificação do número atribuído à amostra fecal e descrição da espécie do primata. Encontram-se também apresentados os resultados da amplificação por PCR para os genes da DNA polimerase (DNA-Pol) e do hexão de adenovírus por amostra fecal (+ fragmento presente; - fragmento ausente).

Amostra	Primata		Origem	Amplificação por PCR	
	Nome comum	Nome científico*		DNA-Pol	Hexão
1	Macaco-uivador-preto	<i>Alouatta caraya</i>	Novo Mundo	-	-
2	Indeterminada [#]	<i>Indeterminada</i>	Novo Mundo	+	-
3	Saguim-cabeça-de-algodão	<i>Saguinus oedipus</i>	Novo Mundo	-	-
4	Macaco-de-nariz-branco	<i>Cercopithecus ascanius</i>	Velho Mundo	+	-
5	Macaco-testiverde	<i>Chlorocebus cynosuros</i>	Velho Mundo	+	+
6	Langur-de-Java	<i>Trachypithecus auratus auratus</i>	Velho Mundo	+	-
7	Langur-de-Java	<i>Trachypithecus auratus auratus</i>	Velho Mundo	+	+
8	Macaco-de-Brazza	<i>Cercopithecus neglectus</i>	Velho Mundo	-	-
9	Saguim-bicolor	<i>Saguinus bicolor</i>	Novo Mundo	+	-
10	Mico-leão-de-juba-dourada	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	Novo Mundo	+	+
11	Macaco-uivador-preto	<i>Alouatta caraya</i>	Novo Mundo	+	-
12	Langur-de-Java	<i>Trachypithecus auratus auratus</i>	Velho Mundo	+	-
13	Macaco-de-beiço-branco	<i>Cercopithecus cephus</i>	Velho Mundo	-	+
14	Macaco-de-nariz-branco	<i>Cercopithecus ascanius</i>	Velho Mundo	+	-
15	Saguim-de-face-branca	<i>Callithrix geoffroyi</i>	Novo Mundo	+	+
16	Saguim-bicolor	<i>Saguinus bicolor</i>	Novo Mundo	-	-
17	Langur-de-Java	<i>Trachypithecus auratus auratus</i>	Velho Mundo	+	-
18	Saguim-imperador	<i>Saguinus imperator subgriseus</i>	Novo Mundo	+	+
19	Saguim-imperador	<i>Saguinus imperator subgriseus</i>	Novo Mundo	+	+
20	Langur-de-Java	<i>Trachypithecus auratus auratus</i>	Velho Mundo	-	+
21	Babuíno-hamadrias	<i>Papio hamadryas</i>	Velho Mundo	+	+
22	Babuíno-hamadrias	<i>Papio hamadryas</i>	Velho Mundo	+	+
23	Babuíno-hamadrias	<i>Papio hamadryas</i>	Velho Mundo	-	-
24	Babuíno-hamadrias	<i>Papio hamadryas</i>	Velho Mundo	-	-

Amostra	Primata		Origem	Amplificação por PCR	
	Nome comum	Nome científico*		DNA-Pol	Hexão
25	Babuíno-hamadrias	<i>Papio hamadryas</i>	Velho Mundo	-	-
26	Babuíno-hamadrias	<i>Papio hamadryas</i>	Velho Mundo	-	-
27	Babuíno-hamadrias	<i>Papio hamadryas</i>	Velho Mundo	-	-
28	Babuíno-hamadrias	<i>Papio hamadryas</i>	Velho Mundo	-	+
29	Babuíno-hamadrias	<i>Papio hamadryas</i>	Velho Mundo	-	+
30	Babuíno-hamadrias	<i>Papio hamadryas</i>	Velho Mundo	-	+
31	Macaco-do-Japão	<i>Macaca fuscata</i>	Velho Mundo	-	+
32	Macaco-do-Japão	<i>Macaca fuscata</i>	Velho Mundo	-	+
33	Macaco-do-Japão	<i>Macaca fuscata</i>	Velho Mundo	-	+
34	Macaco-do-Japão	<i>Macaca fuscata</i>	Velho Mundo	-	+
35	Macaco-do-Japão	<i>Macaca fuscata</i>	Velho Mundo	+	+
36	Macaco-do-Japão	<i>Macaca fuscata</i>	Velho Mundo	+	+
37	Macaco-do-Japão	<i>Macaca fuscata</i>	Velho Mundo	-	+
38	Macaco-do-Japão	<i>Macaca fuscata</i>	Velho Mundo	-	+
39	Macaco-do-Japão	<i>Macaca fuscata</i>	Velho Mundo	+	+
40	Macaco-do-Japão	<i>Macaca fuscata</i>	Velho Mundo	+	+
41	Macaco-de-Brazza	<i>Cercopithecus neglectus</i>	Velho Mundo	-	-
42	Macaco-aranha-da-Colômbia	<i>Ateles fusciceps rufiventris</i>	Novo Mundo	+	-
43	Macaco-aranha-da-Colômbia	<i>Ateles fusciceps rufiventris</i>	Novo Mundo	-	-
44	Macaco-aranha-da-Colômbia	<i>Ateles fusciceps rufiventris</i>	Novo Mundo	-	-
45	Siamango	<i>Symphalangus syndactylus</i>	Velho Mundo	-	+
46	Macaco-aranha-da-Colômbia	<i>Ateles fusciceps rufiventris</i>	Novo Mundo	+	-
47	Macaco-de-Brazza	<i>Cercopithecus neglectus</i>	Velho Mundo	+	-
48	Macaco-de-Brazza	<i>Cercopithecus neglectus</i>	Velho Mundo	+	-
49	Saguim-cabeça-de-algodão	<i>Saguinus oedipus</i>	Novo Mundo	+	-
50	Macaco-de-Brazza	<i>Cercopithecus neglectus</i>	Velho Mundo	+	-
51	Macaco-aranha-da-Colômbia	<i>Ateles fusciceps rufiventris</i>	Novo Mundo	+	-
52	Macaco-cauda-de-leão	<i>Macaca silenus</i>	Velho Mundo	+	-
53	Macaco-Diana	<i>Cercopithecus diana</i>	Velho Mundo	+	-
54	Macaco-cauda-de-leão	<i>Macaca silenus</i>	Velho Mundo	+	+

Amostra	Primata		Origem	Amplificação por PCR	
	Nome comum	Nome científico*		DNA-Pol	Hexão
55	Macaco-cauda-de-leão	<i>Macaca silenus</i>	Velho Mundo	+	-
56	Macaco-Diana	<i>Cercopithecus diana</i>	Velho Mundo	-	+
57	Macaco-cauda-de-leão	<i>Macaca silenus</i>	Velho Mundo	+	-
58	Macaco-cauda-de-leão	<i>Macaca silenus</i>	Velho Mundo	+	-
59	Macaco-de-nariz-branco	<i>Cercopithecus ascanius</i>	Velho Mundo	-	+
60	Macaco-de-nariz-branco	<i>Cercopithecus ascanius</i>	Velho Mundo	-	+
61	Gibão-de-mãos-brancas	<i>Hylobates lar</i>	Velho Mundo	+	+
62	Gibão-de-mãos-brancas	<i>Hylobates lar</i>	Velho Mundo	+	+
63	Gibão-de-mãos-brancas	<i>Hylobates lar</i>	Velho Mundo	+	-
64	Gibão-de-mãos-brancas	<i>Hylobates lar</i>	Velho Mundo	+	-
65	Macaco-capuchinho-de-peito-amarelo	<i>Sapajus xanthosternus</i>	Novo Mundo	+	+
66	Macaco-capuchinho-de-peito-amarelo	<i>Sapajus xanthosternus</i>	Novo Mundo	+	-
67	Macaco-capuchinho-de-peito-amarelo	<i>Sapajus xanthosternus</i>	Novo Mundo	+	-
68	Macaco-capuchinho-de-peito-amarelo	<i>Sapajus xanthosternus</i>	Novo Mundo	+	-
69	Macaco-capuchinho-de-peito-amarelo	<i>Sapajus xanthosternus</i>	Novo Mundo	+	-
70	Saguim-de-mãos-douradas	<i>Saguinus midas</i>	Novo Mundo	+	-
71	Saguim-de-mãos-douradas	<i>Saguinus midas</i>	Novo Mundo	-	+
72	Macaco-fidalguinho	<i>Sapajus apella</i>	Novo Mundo	+	-
73	Macaco-fidalguinho	<i>Sapajus apella</i>	Novo Mundo	+	-
74	Macaco-fidalguinho	<i>Sapajus apella</i>	Novo Mundo	+	-
75	Siamango	<i>Symphalangus syndactylus</i>	Velho Mundo	+	+
76	Saguim-comum	<i>Callithrix jacchus</i>	Novo Mundo	-	-
77	Saguim-comum	<i>Callithrix jacchus</i>	Novo Mundo	+	-
78	Mico-leão-dourado	<i>Leontopithecus rosalia</i>	Novo Mundo	+	-
79	Mico-leão-dourado	<i>Leontopithecus rosalia</i>	Novo Mundo	+	-
80	Mico-leão-dourado	<i>Leontopithecus rosalia</i>	Novo Mundo	+	-
81	Colobo-guereza-kikuyu	<i>Colobus guereza kikuyuensis</i>	Velho Mundo	-	+
82	Macaco-de-Goeldi	<i>Callimico goeldii</i>	Novo Mundo	-	-
83	Colobo-guereza-kikuyu	<i>Colobus guereza kikuyuensis</i>	Velho Mundo	+	+
84	Macaco-de-Goeldi	<i>Callimico goeldii</i>	Novo Mundo	-	-

Amostra	Primata		Origem	Amplificação por PCR	
	Nome comum	Nome científico*		DNA-Pol	Hexão
85	Colobo-guereza-kikuyu	<i>Colobus guereza kikuyuensis</i>	Velho Mundo	+	-
86	Saimiri-da-Bolívia	<i>Saimiri boliviensis</i>	Novo Mundo	-	+
87	Saimiri-da-Bolívia	<i>Saimiri boliviensis</i>	Novo Mundo	-	-
88	Macaco-de-Goeldi	<i>Callimico goeldii</i>	Novo Mundo	-	-
89	Colobo-guereza-kikuyu	<i>Colobus guereza kikuyuensis</i>	Velho Mundo	+	+
90	Saimiri-da-Bolívia	<i>Saimiri boliviensis</i>	Novo Mundo	-	-
91	Macaco-de-Goeldi	<i>Callimico goeldii</i>	Novo Mundo	+	-
92	Colobo-guereza-kikuyu	<i>Colobus guereza kikuyuensis</i>	Velho Mundo	+	-
93	Saimiri-da-Bolívia	<i>Saimiri boliviensis</i>	Novo Mundo	-	-
94	Saimiri-da-Bolívia	<i>Saimiri boliviensis</i>	Novo Mundo	-	-
95	Lémure-de-cauda-anelada	<i>Lemur catta</i>	Madagáscar	-	+
96	Lémure-de-cauda-anelada	<i>Lemur catta</i>	Madagáscar	+	+
97	Lémure-de-cauda-anelada	<i>Lemur catta</i>	Madagáscar	+	+
98	Lémure-de-cauda-anelada	<i>Lemur catta</i>	Madagáscar	-	+
99	Lémure-de-cauda-anelada	<i>Lemur catta</i>	Madagáscar	+	-
100	Lémure-preto	<i>Eulemur macaco macaco</i>	Madagáscar	+	+
101	Lémure-preto	<i>Eulemur macaco macaco</i>	Madagáscar	+	+
102	Lémure-preto	<i>Eulemur macaco macaco</i>	Madagáscar	+	+
103	Lémure-preto	<i>Eulemur macaco macaco</i>	Madagáscar	+	+
104	Lémure-preto-e-branco-de-colar	<i>Varecia variegata variegata</i>	Madagáscar	+	+
105	Lémure-preto-e-branco-de-colar	<i>Varecia variegata variegata</i>	Madagáscar	+	+
106	Lémure-preto-e-branco-de-colar	<i>Varecia variegata variegata</i>	Madagáscar	+	-
107	Lémure-preto-e-branco-de-colar	<i>Varecia variegata variegata</i>	Madagáscar	+	-
108	Lémure-preto-e-branco-de-colar	<i>Varecia variegata variegata</i>	Madagáscar	+	+
109	Lémure-de-fronte-branca	<i>Eulemur albifrons</i>	Madagáscar	+	-
110	Lémure-vermelho	<i>Varecia variegata rubra</i>	Madagáscar	+	+
111	Lémure-de-fronte-branca	<i>Eulemur albifrons</i>	Madagáscar	+	-
112	Gorila-ocidental-das-terras-baixas	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	Velho Mundo	+	+
113	Gorila-ocidental-das-terras-baixas	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	Velho Mundo	-	-
114	Gorila-ocidental-das-terras-baixas	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	Velho Mundo	-	-

Amostra	Primata		Origem	Amplificação por PCR	
	Nome comum	Nome científico*		DNA-Pol	Hexão
115	Orangotango-de-Samatra	<i>Pongo abelii</i>	Velho Mundo	-	+
116	Orangotango-de-Samatra	<i>Pongo abelii</i>	Velho Mundo	+	+
117	Orangotango-de-Samatra	<i>Pongo abelii</i>	Velho Mundo	-	+
118	Orangotango-de-Samatra	<i>Pongo abelii</i>	Velho Mundo	-	+
119	Chimpanzé-comum	<i>Pan troglodytes</i>	Velho Mundo	+	+
120	Chimpanzé-comum	<i>Pan troglodytes</i>	Velho Mundo	-	+
121	Chimpanzé-comum	<i>Pan troglodytes</i>	Velho Mundo	+	+
122	Chimpanzé-comum	<i>Pan troglodytes</i>	Velho Mundo	-	+
123	Chimpanzé-comum	<i>Pan troglodytes</i>	Velho Mundo	+	+
124	Chimpanzé-comum	<i>Pan troglodytes</i>	Velho Mundo	+	+
125	Chimpanzé-comum	<i>Pan troglodytes</i>	Velho Mundo	+	+
126	Chimpanzé-comum	<i>Pan troglodytes</i>	Velho Mundo	+	+
127	Chimpanzé-comum	<i>Pan troglodytes</i>	Velho Mundo	-	+
128	Chimpanzé-comum	<i>Pan troglodytes</i>	Velho Mundo	+	+

* De acordo com Pecon-Slaterry, 2014. # Animais em coabitação, isto é, saguim-de-tufos-negros (*Callithrix penicillata*) e mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*).

Anexo 4

Dados preliminares resultantes da pesquisa de homologia genética no programa BLAST das sequências obtidas, após sequenciação de plasmídeos recombinantes com insertos de tamanho esperado para DNA polimerase (Parte 1) e hexão (Parte 2). Encontra-se apresentada informação relativa a números de clones enviados para sequenciação de DNA por amostra e respetiva informação, fornecida pelo programa, de uma das sequências homólogas (descrição da sequência, *query cover*, *e-value*, identidade e número de acesso). Algumas sequências, identificadas nas tabelas, foram rejeitadas previamente a esta pesquisa. Encontra-se destacadas a negrito as sequências homólogas às utilizadas posteriormente na análise filogenética.

Parte 1

Amostra	Clone	Descrição da sequência	Query cover	E-value	Identidade	Número de acesso
7	#1 (1)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
12	#1 (4)	Burkholderia cenocepacia strain DDS 22E-1 chromosome 3, complete sequence	6%	0.016	88%	CP007782.1
	#2 (5)	Clostridium scindens strain VPI 12708 bile acid-inducible operon, partial sequence	44%	5E-28	71%	U57489.2
18	#1 (3)	Simian adenovirus A1139, complete genome	98%	1E-150	83%	JN880448.1
19	#1 (1)	Elizabethkingia sp. BM10, complete genome	26%	2E-08	75%	CP011059.1
	#2 (2)	Flavobacterium psychrophilum strain Z2, complete genome	5%	0.18	94%	CP012586.1
35	#1 (1)	Hymenobacter sp. APR13, complete genome	44%	8E-12	69%	CP006587.1
	#2 (2)	Rhesus adenovirus 53, complete genome	100%	0.0	98%	KM591903.1
	#3 (4)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
36	#1 (2)	Prevotella dentalis DSM 3688 chromosome 1, complete sequence	97%	7E-115	75%	CP003368.1
	#2 (4)	Prevotella denticola F0289, complete genome	33%	8E-19	72%	CP002589.1
39	#1 (2)	TPA: Microbulbifer degradans 2-40 N-acetyl-glucosaminidase (hexA) gene, complete cds	7%	0.054	83%	BK001046.1
	#2 (5)	Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482, complete genome	31%	2E-21	74%	AE015928.1

Amostra	Clone	Descrição da sequência	Query cover	E-value	Identidade	Número de acesso
40	#1 (3)	Selenomonas ruminantium subsp. lactilytica TAM6421 DNA, complete genome	5%	0.016	94%	AP012292.1
	#2 (5)	Cucumis melo genomic chromosome, chr_5	6%	0.67	89%	LN713259.1
61	#1 (1)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
	#2 (3)	Simian adenovirus 40.1, complete genome	100%	0.0	88%	FJ025907.1
62	#1 (1)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
	#2 (4)	Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482, complete genome	31%	2E-21	74%	AE015928.1
75	#1 (1)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
	#2 (3)	Gynuella sunshinyii YC6258, complete genome	10%	0.64	80%	CP007142.1
89	#1 (1)	Simian adenovirus 3 strain ATCC VR-1449, complete genome	100%	1E-174	85%	AY598782.1
	#2 (2)	Simian adenovirus 3 strain ATCC VR-1449, complete genome	100%	1E-174	85%	AY598782.1
96	#1 (1)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
	#2 (4)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
97	#1 (5)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
	#2 (7)	Human adenovirus F, complete genome*	100%	0.0	99%	L19443.1
	#3 (9)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
100	#1 (3)	Unidentified simian adenovirus partial E2B gene for polymerase, strain u7259	57%	1E-45	79%	LN829034.1
	#2 (5)	Simian adenovirus 42.2, complete genome	73%	3E-46	76%	FJ025902.1
103	#1 (2)	Simian adenovirus B isolate BaAdV-1, complete genome	93%	5E-78	73%	KC693021.1
	#2 (4)	Simian adenovirus 24 strain ATCC VR-593, complete genome	93%	4E-79	73%	AY530878.1
104	#1 (1)	Pragia fontium strain 24613, complete genome	39%	3E-26	77%	CP010423.1
	#2 (5)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
105	#1 (1)	Unidentified simian adenovirus partial E2B gene for polymerase, strain u7259	45%	1E-40	78%	LN829034.1
	#2 (3)	Human adenovirus F, complete genome*	100%	0.0	99%	L19443.1
108	#1 (2)	Human adenovirus F, complete genome*	100%	0.0	99%	L19443.1

Amostra	Clone	Descrição da sequência	Query cover	E-value	Identidade	Número de acesso
	#2 (3)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
	#3 (4)	Human adenovirus F, complete genome*	100%	0.0	99%	L19443.1
	#4 (5)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
109	#1 (2)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
	#2 (3)	Human adenovirus F, complete genome*	100%	0.0	99%	L19443.1
	#3 (4)	PREDICTED: Thamnophis sirtalis INO80 complex subunit D (INO80D), mRNA	5%	0.62	93%	XM_014052995.1
110	#1 (1)	Human adenovirus F, complete genome*	100%	0.0	99%	L19443.1
	#2 (6)	Human adenovirus F, complete genome*	100%	0.0	99%	L19443.1
112	#1 (2)	Gorilla gorilla adenovirus B7 DNA polymerase gene, partial cds; (...)	100%	0.0	100%	HQ292614.1
116	#1 (1)	Unidentified simian adenovirus partial E2B gene for polymerase, strain u7314	100%	0.0	99%	LN829003.1
119	#1 (2)	Unidentified simian adenovirus partial E2B gene for polymerase, strain u6208	100%	0.0	99%	LN829036.1
123	#1 (1)	Unidentified simian adenovirus partial E2B gene for polymerase, strain u5753	100%	0.0	96%	LN829111.1

* Contaminação com o controlo positivo utilizado.

Parte 2

Amostra	Clone	Descrição da sequência	Query cover	E-value	Identidade	Número de acesso
7H	#1 (5)	Simian adenovirus KRF-2014 strain SAdV.Rh/CHN-23/2002 hexon gene, complete cds	98%	1E-107	88%	KF053123.1
10H	#1 (4)	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 19	10%	0.34	91%	FR799606.2
13H	#1 (1)	Beauveria bassiana ARSEF 2860 hsp20-like protein partial mRNA	11%	0.028	89%	XM_008602983.1

Amostra	Clone	Descrição da sequência	Query cover	E-value	Identidade	Número de acesso
18H	#1 (5)	Titi monkey adenovirus ECC-2011, complete genome	100%	2E-86	84%	HQ913600.1
19H	#1 (1)	Titi monkey adenovirus ECC-2011, complete genome	100%	2E-86	84%	HQ913600.1
	#2 (1)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
22H	#1 (4)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
28H	#1 (3)	Aeromonas hydrophila NJ-35, complete genome	16%	0.097	80%	CP006870.1
29H	#1 (1)	Aeromonas hydrophila NJ-35, complete genome	16%	0.097	80%	CP006870.1
31H	#1 (5)	Aeromonas hydrophila NJ-35, complete genome	16%	0.097	80%	CP006870.1
35H	#1 (1)	Simian adenovirus 1 strain ATCC VR-195, complete genome	98%	9E-119	90%	AY771780.1
38H	#1 (2)	Aeromonas hydrophila NJ-35, complete genome	16%	0.097	80%	CP006870.1
45H	#1 (1)	Human mastadenovirus C isolate 6587 pVII gene, partial cds; pV, pX, and pVI genes, (...)	100%	8E-95	85%	KM659149.1
59H	#1 (2)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
60H	#1 (5)	Human adenovirus 1 isolate CU-C553 hexon gene, partial cds	96%	1E-47	78%	KC632712.1
61H	#1 (1)	Simian adenovirus 25.2, complete genome	100%	2E-111	88%	FJ025918.1
62H	#1 (1)	Human mastadenovirus C isolate 6736 pVII gene, partial cds; pV, pX, and pVI genes, (...)	97%	8E-90	85%	KM659160.1
75H	#1 (3)	Human mastadenovirus C isolate 6587 pVII gene, partial cds; pV, pX, and pVI genes, (...)	100%	8E-95	85%	KM659149.1
81H	#1 (1)	Uncultured bacterium clone LM0ACA1ZF06RM1 genomic sequence	24%	1E-06	78%	EU065203.1
83H	#1 (1)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
	#2 (4)	Piliocolobus badius adenovirus 3 hexon gene, partial cds	100%	3E-118	90%	JN163999.1
86H	#1 (1)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
89H	#1 (1)	Piliocolobus badius adenovirus 3 hexon gene, partial cds	100%	3E-118	90%	JN163999.1
	#2 (4)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
96H	#1 (3)	Porcine adenovirus 3 isolate PGAH389/Cote d'Ivoire/2012 hexon gene, partial cds	98%	6E-31	74%	KP274050.1

Amostra	Clone	Descrição da sequência	Query cover	E-value	Identidade	Número de acesso
97H	#1 (1)	Porcine adenovirus 3 isolate PGAH389/Cote d'Ivoire/2012 hexon gene, partial cds	100%	2E-31	74%	KP274050.1
100H	#1 (1)	Porcine adenovirus 3 isolate PGAH389/Cote d'Ivoire/2012 hexon gene, partial cds	100%	2E-36	75%	KP274050.1
103H	#1 (5)	Porcine adenovirus 3 isolate PGAH389/Cote d'Ivoire/2012 hexon gene, partial cds	100%	8E-40	76%	KP274050.1
104H	#1 (1)	Human mastadenovirus E isolate 6329 pVII gene, partial cds; pV, pX, and pVI genes, (...)	100%	1E-57	76%	KM659130.1
105H	#1 (2)	Human adenovirus 6 isolate WX20130423c hexon gene, partial cds	96%	2E-10	72%	KF954040.1
108H	#1 (4)	Human adenovirus 6 isolate WX20130423c hexon gene, partial cds	96%	2E-20	73%	KF954040.1
110H	#1 (1)	Clostridiales sp. SS3/4 draft genome	97%	4E-63	78%	FP929062.1
112H	#1 (1)	Simian adenovirus 41.2, complete genome	100%	3E-178	100%	FJ025927.1
116H	#1 (1)	Simian adenovirus 32, complete genome	100%	1E-166	98%	FJ025911.1
117H	#1 (1)	<i>Não foi possível obter sequência de qualidade</i>				
118H	#1 (1)	Simian adenovirus 31.1, complete genome	100%	4E-83	83%	FJ025906.1
119H	#1 (2)	Chimpanzee adenovirus Y25, complete genome	100%	3E-178	100%	JN254802.1
123H	#1 (5)	Chimpanzee adenovirus Y25, complete genome	100%	3E-178	100%	JN254802.1
127H	#1 (5)	Human adenovirus 21, complete genome	99%	7E-170	99%	KF528688.1

Anexo 5

Sequências de adenovírus incluídas na análise filogenética, com o respectivo número de acesso.

Sequência	Número de acesso
AdV humano 1	AC_000017
AdV humano 1*	KC632712
AdV humano 2	AC_000007
AdV humano 3	AY599834
AdV humano 4	AY594253
AdV humano 5	AC_000008
AdV humano 6	FJ349096
AdV humano 6*	KF954040
AdV humano 7	AY594255
AdV humano 8	AB448769
AdV humano 9	NC_010956
AdV humano 10	JN226746
AdV humano 11	AY163756
AdV humano 12	NC_001460
AdV humano 13	JN226747
AdV humano 14	AY803294
AdV humano 15	JN226748
AdV humano 16	AY601636
AdV humano 17	AC_000006
AdV humano 18	GU191019
AdV humano 19	JQ326209
AdV humano 20	JN226749
AdV humano 21	AY601633
AdV humano 22	FJ619037
AdV humano 23	JN226750
AdV humano 24	JN226751
AdV humano 25	JN226752
AdV humano 26	EF153474
AdV humano 27	JN226753
AdV humano 28	FJ824826
AdV humano 29	JN226754
AdV humano 30	JN226755
AdV humano 31	AM749299
AdV humano 32	JN226756
AdV humano 33	JN226758
AdV humano 34	AY737797
AdV humano 35	AY271307
AdV humano 36	GQ384080
AdV humano 37	DQ900900
AdV humano 38	JN226759
AdV humano 39	JN226760
AdV humano 40	NC_001454
AdV humano 41	DQ315364
AdV humano 42	JN226761

Sequência	Número de acesso
AdV humano 43	JN226762
AdV humano 44	JN226763
AdV humano 45	JN226764
AdV humano 46	AY875648
AdV humano 47	JN226757
AdV humano 48	EF153473
AdV humano 49	DQ393829
AdV humano 50	AY737798
AdV humano 51	JN226765
AdV humano 52	DQ923122
AdV humano 53	AB605245
AdV humano 54	NC_012959
AdV humano 55	FJ643676
AdV humano 56	HM770721
AdV humano 57	HQ003817
AdV humano 58	HQ883276
AdV humano 60	JN162672
AdV humano 61	JF964962
AdV humano 62	JN162671
AdV humano 63	JN935766
AdV humano 64	JQ326206
AdV humano 65	AP012285
AdV humano 66	JN860676
AdV humano 67	AP012302
AdV humano 68	JN860678
AdV humano 69	JN226748
AdV símio 1	AY771780
AdV símio 2 [#]	KP853120
AdV símio 3	AY598782
AdV símio 4 [#]	KP853121
AdV símio 5 [#]	KP853111
AdV símio 6	JQ776547
AdV símio 7	DQ792570
AdV símio 8	KP329561
AdV símio 9 [#]	KP853122
AdV símio 10 [#]	KP853110
AdV símio 11	KP329562
AdV símio 12 [#]	KP853123
AdV símio 13	KP329563
AdV símio 14 [#]	KP853124
AdV símio 15 [#]	KP853109
AdV símio 16	KP329564
AdV símio 18	NC_022266
AdV símio 19	KP329565
AdV símio 20	HQ605912
AdV símio 21	AC_000010
AdV símio 22	AY530876
AdV símio 23	AY530877
AdV símio 24	AY530878

Sequência	Número de acesso
AdV símio 25	AC_000011
AdV símio 26	FJ025923
AdV símio 27.1	FJ025909
AdV símio 28.1	FJ025914
AdV símio 29	FJ025916
AdV símio 30	FJ025920
AdV símio 31.1	FJ025906
AdV símio 32	FJ025911
AdV símio 34	FJ025905
AdV símio 35.1	FJ025912
AdV símio 36	FJ025917
AdV símio 37.1	FJ025921
AdV símio 38	FJ025922
AdV símio 39	FJ025924
AdV símio 40.1	FJ025907
AdV símio 41.1	FJ025913
AdV símio 42.1	FJ025903
AdV símio 43	FJ025900
AdV símio 44	FJ025899
AdV símio 45	FJ025901
AdV símio 46	FJ025930
AdV símio 47	FJ025929
AdV símio 48	HQ241818
AdV símio 49	HQ241819
AdV símio 50	HQ241820
AdV símio A1139	JN880448
AdV símio A1163	JN880449
AdV símio A1173	JN880450
AdV símio A1258	JN880451
AdV símio A1285	JN880452
AdV símio A1296	JN880453
AdV símio A1312	JN880454
AdV símio A1327	JN880455
AdV símio A1335	JN880456
AdV símio BaAdV-1	KC693021
AdV símio BaAdV-2	KC693022
AdV símio BaAdV-3	KC693023
AdV chimpanzé Y25	NC_017825
AdV rhesus 51	KM591901
AdV rhesus 52	KM591902
AdV rhesus 53	KM591903
AdV <i>Pan troglodytes verus</i> 8*	JN163978
AdV <i>Pan troglodytes schweinfurthii</i> 11*	JN163981
AdV <i>Pan troglodytes schweinfurthii</i> 14*	JN163984
AdV <i>Gorilla gorilla beringei</i> 3*	JN163987
AdV <i>Gorilla gorilla beringei</i> 5*	JN163989
AdV <i>Gorilla gorilla beringei</i> 6*	JN163990
AdV <i>Ptilocolobus badius</i> 3*	JN163999
AdV <i>Gorilla gorilla</i> B7	HQ292614

Sequência	Número de acesso
AdV símio 23336	KM190146
AdV símio CHN-23*	KF053123
AdV símio CHN-24*	KF053124
AdV símio CHN-30*	KF053125
AdV símio CHN-51*	KF053130
AdV símio ch1	KF360047
AdV símio 6329*	KM659130
AdV símio 6736*	KM659160
AdV símio u7314 [#]	LN829003
AdV símio u7259 [#]	LN829034
AdV símio u6208 [#]	LN829036
AdV macaco-titi	NC_020487
AdV <i>Callithrix pygmaea</i> 742 [#]	HM245776
AdV morcego 2	JN252129
AdV morcego 3*	GU226970
AdV canino 2*	U77082
AdV canino DKEI526*	KP274043
AdV equino 1	JN418926
AdV bovino 2*	NC_002513
AdV ovino 6*	DQ630759
AdV suíno 3*	KP274052
AdV suíno 3*	AB026117
AdV suíno 5 [#]	AF289262
AdV tupaia 1	AF258784
AdV esturjão-branco 1*	AJ_495768
AdV cobra 1 [#]	NC_009989

* Apenas na árvore filogenética de sequências nucleotídicas do hexão.

[#] Apenas na árvore filogenética de sequências nucleotídicas da DNA polimerase.